



**HAL**  
open science

# Étude de la productivité et de la sélectivité de la biosynthèse de mycosubtiline, un antibiotique surfactant de *Bacillus subtilis*: apports du génie biochimique et de la transcriptomique

Jean-Sebastien Guez

► **To cite this version:**

Jean-Sebastien Guez. Étude de la productivité et de la sélectivité de la biosynthèse de mycosubtiline, un antibiotique surfactant de *Bacillus subtilis*: apports du génie biochimique et de la transcriptomique. Biotechnologies. Université des Sciences et Technologies de Lille, 2007. Français. NNT: . tel-02939573

**HAL Id: tel-02939573**

**<https://hal.science/tel-02939573>**

Submitted on 16 Sep 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université des Sciences et Technologies de Lille

# Thèse

Présentée par Jean-Sébastien GUEZ

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Option : Ingénierie des Fonctions Biologiques

---

ÉTUDE DE LA PRODUCTIVITE ET DE LA SELECTIVITE DE  
LA BIOSYNTHESE DE MYCOSUBTILINE, UN ANTIBIOTIQUE  
SURFACTANT DE *BACILLUS SUBTILIS*

APPORTS DU GENIE BIOCHIMIQUE ET DE LA TRANSCRIPTOMIQUE

---

Préparée au Laboratoire PROBIOGEM, UPRES-EA 1026

Soutenue le 21 novembre 2007 devant le Jury composé de:

Didier GUILLOCHON, Professeur	(Université des Sciences et Technologies de Lille, France)	Président
Philippe JACQUES, Professeur	(Université des Sciences et Technologies de Lille, France)	Directeur
Françoise BESSON, Docteur d'Etat	(Université Claude Bernard de Lyon, France)	Rapporteur
Bernard JORIS, Professeur	(Centre d'Ingénierie des Protéines de Liège, Belgique)	Rapporteur
Paula JAUREGI, Professeur	(Université de Reading, Angleterre)	Examinatrice

SCD LILLE 1



D 030 300787 7

eu/m

A ma famille



## Remerciements

J'exprime toute ma reconnaissance à Philippe Jacques, directeur de ma thèse et responsable d'équipe au sein du laboratoire ProBioGEM, pour la confiance qu'il m'a accordé durant ces trois années, notamment lorsqu'il a fallu développer de nouveaux outils ou faire vivre les collaborations, et pour sa passion pour la recherche, qu'il a su me transmettre. Merci à lui d'avoir donné tant que possible de l'air à ma frêle embarcation dans les périodes de dévente.

Je tiens à remercier chaleureusement Didier Guillochon, directeur du laboratoire ProBioGEM, pour m'avoir laissé la chance de réaliser une thèse dans le cadre de mon activité d'ingénieur de recherche. Merci à lui d'avoir accepté de présider le jury de la thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à Françoise Besson et à Bernard Joris pour avoir accepté de juger et critiquer ce travail en endossant le rôle de rapporteur. Un grand merci aussi à Paula Jauregi pour avoir accepté celui d'examinatrice.

Je remercie Jean-Philippe Cassar, pour qui j'ai une pensée particulière, Jorgen Büchs et Pierre-Marie Danzé, pour leurs précieux conseils et leur collaboration, essentielle à ce travail.

J'en profite pour saluer trois personnes qui ont eu rôle indirect crucial dans ce travail, Jacques Baratti, Anne Lomascolo et Bruno Cabane.

Je tiens également à dire un très grand merci à Max Béchet, Anne-sophie Drucbert et Carsten Müller pour avoir accepté de m'assister lors de mes premiers pas en bio-mol, transcriptomique et système RAMOS. Je pense aussi à Salah Chenicker, Bernard Wathelet, Valérie Leclère, François Coutte et Patrick Fickers qui ont chacun à leur manière apporté une brique à l'édifice. Je n'oublierai pas trois stagiaires formidables que j'ai eu la chance d'encadrer, Audrey Benedetti, Caroline Dalenne et Aurore Gheeraert. Je passe un salut affectueux à mes collègues de Polytech-lille, Patrick Méninger du service info et la famille Demolle de la conciergerie, à qui j'ai donné quelques soucis lors des manipulations nocturnes.

Je salue très amicalement tous les membres du laboratoire ProBioGEM, joueurs de badminton, coureurs, footballeurs, rugbymens, cinévores, passionné(e)s d'équitation, de voyages lointains, de plongée, de jardinage, de bricolage, de cuisine ou de puériculture, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions, toujours enrichissantes et parfois agitées ! Je tiens finalement à adresser un grand salut à mon compère Laurent Bonneau pour sa présence au quotidien.

## SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>4</b>
<b>CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>14</b>
<b>1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>15</b>
1.1. <i>BACILLUS SUBTILIS</i> : ORGANISME MODELE DES GRAM <sup>+</sup> .....	15
1.2. LES PEPTIDES NON RIBOSOMAux ET LEUR SYNTHESE.....	17
1.3. LIPOPEPTIDES DE <i>B. SUBTILIS</i> .....	23
1.4. LA MYCOSUBTILINE : UN LIPOPEPTIDE ITURINIQUE DE <i>B. SUBTILIS</i> .....	24
1.4.1. FAMILLE DES ITURINES .....	24
1.4.2. PROPRIETES DES ITURINES .....	27
1.4.2.1. Propriétés tensioactives et moussantes .....	28
1.4.2.2. Propriétés biologiques .....	29
1.4.2.2.1. Activité antifongique .....	29
1.4.2.2.2. Activité antibactérienne.....	30
1.4.2.2.3. Activité hémolytique .....	31
1.5. SYNTHESE DE LA MYCOSUBTILINE CHEZ <i>B. SUBTILIS</i> .....	32
1.5.1. LA MYCOSUBTILINE SYNTHETASE : UNE ENZYME MULTIFONCTIONNELLE HYBRIDE.....	32
1.5.2. SYNTHESE DU MOTIF D'ACIDES GRAS .....	35
1.6. PRODUCTION D'ITURINE.....	39
1.7. DOMAINES D'APPLICATION POTENTIELLE DES ITURINES .....	41
1.7.1. EN AGRO-ALIMENTAIRE ET VETERINAIRE .....	41
1.7.2. EN PHARMACEUTIQUE .....	42
1.8. ETUDES TRANSCRIPTOMIQUES CHEZ <i>B. SUBTILIS</i> .....	42
<b>SITUATION ET OBJECTIF DU TRAVAIL</b> .....	<b>44</b>

<b>2. MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>46</b>
<b>2.1. SOUCHES UTILISEES .....</b>	<b>46</b>
<b>2.2 MILIEUX DE CULTURE.....</b>	<b>47</b>
2.2.1. LE MILIEU DE LANDY.....	47
2.2.1.1. Composition .....	47
2.2.1.2. Solutions stocks.....	47
2.2.1.3. Réalisation d'un litre de milieu de Landy .....	48
2.2.1.4. Réalisation d'un milieu de Landy tamponné à 100 mM .....	48
2.2.1.5. Milieu de Landy modifié.....	48
2.2.2. LE MILIEU ACS.....	49
2.2.3. MILIEU DSM.....	49
2.2.4. MILIEU E MODIFIE .....	50
2.2.5. MILIEU LURIA-BERTANI (LB) .....	50
2.2.6. MILIEU MS1 .....	50
2.2.7. GÉLOSES .....	50
<b>2.3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....</b>	<b>51</b>
2.3.1. EXTRACTIONS D'ADN ET PCR.....	51
2.3.2. EXTRACTION DE PLASMIDES PAR LA METHODE « BOILING » .....	51
2.3.3. ENZYMES ET KITS DE PURIFICATION .....	51
2.3.4. CLONAGE DANS LE PLASMIDE PGEM-T EASY .....	52
2.3.5. TRANSFORMATION DANS <i>B. SUBTILIS</i> .....	52
<b>2.4. EXTRACTION DES ARN TOTAUX CHEZ <i>B. SUBTILIS</i> .....</b>	<b>53</b>
2.4.1. KIT QIAGEN RNEASY® .....	53
2.4.1.1. Blocage.....	53
2.4.1.2. Extraction .....	54
2.4.2. KIT AMBION RIBO-PURE BACTERIA® .....	54
2.4.2.1. Blocage.....	54
2.4.2.2. Extraction .....	54
2.4.3. CONTROLE DES ARN EXTRAITS .....	55
2.4.3.1. Détermination de la quantité des ARN extraits.....	55
2.4.3.2. Détermination de la qualité des ARN extraits.....	56
<b>2.5. PUCES A ADN .....</b>	<b>56</b>
2.5.1. PRINCIPE TECHNOLOGIE DES PUCES A ADN.....	56
2.5.2. TRANSCRIPTION INVERSE ET MARQUAGE FLUORESCENT DES TRANSCRITS.....	59

2.5.3. HYBRIDATION SUR BIOPUCES ET LAVAGE .....	60
2.5.4. ANALYSE DES DONNEES DES PUCES A ADN .....	61
2.5.4.1. Logiciel Midas.....	61
2.5.4.2. Tableur .....	62
2.5.4.3. Logiciel KegArray.....	62
2.5.5. PCR COMPARATIVE .....	63
<b>2.6. CULTURES EN FIOLES D'ERLENMEYER DE <i>B. SUBTILIS</i> .....</b>	<b>64</b>
2.6.1. PREPARATION D'UN SOUCHIER .....	64
2.6.2. PREPARATION D'UN INOCULUM.....	65
2.6.3. CULTURES EN FIOLES D'ERLENMEYER.....	65
2.6.4. CULTURES EN FIOLES RAMOS.....	66
2.6.4.1. Description du système RAMOS .....	66
2.6.4.2. Cultures en système RAMOS.....	67
<b>2.6.5. CULTURES EN MICROPLAQUE .....</b>	<b>68</b>
<b>2.6.6. CULTURES EN BIOREACTEUR .....</b>	<b>68</b>
<b>2.7. ANALYSES .....</b>	<b>69</b>
2.7.1. MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE A 600 NM.....	69
2.7.2. MESURE DU POIDS SEC.....	70
2.7.3. MESURE DU PH .....	70
2.7.4. PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES ET ANALYSES .....	70
2.7.4.1. Purification des lipopeptides .....	70
2.7.4.2. Analyses par chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	70
2.7.4.3. Analyses par CLHP semi-préparative .....	71
2.7.4.4. Analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	72
2.7.4.5. Chromatographie sur couche mince .....	72
2.7.5. DOSAGE DU GLUCOSE, DE L' ACIDE ACÉTIQUE, LACTIQUE ET OXALIQUE EN CLHP .....	73
2.7.6. DOSAGE DE L' ACIDE GLUTAMIQUE .....	73
2.7.6.1. Par CLHP .....	73
2.7.6.2. Par kit enzymatique.....	73
<b>2.8. TESTS D'ACTIVITES BIOLOGIQUES.....</b>	<b>75</b>
2.8.1. POUVOIR ANTIFONGIQUE.....	75
2.8.2. POUVOIR HEMOLYTIQUE.....	75

<b><u>3. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES MYCOSUBTILINES ET EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LEUR SYNTHESE PAR B. SUBTILIS</u></b> .....	<b>77</b>
<b>3.1. TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES ISOFORMES DE MYCOSUBTILINE</b> .....	<b>77</b>
3.1.1. INTRODUCTION .....	77
3.1.2. PURIFICATION DES ISOFORMES DE MYCOSUBTILINES .....	77
3.1.3. TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE ET DETERMINATION DE LA CMI .....	78
3.1.4. EN BREF .....	80
<b>3.2. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE DE REFERENCE</b> .....	<b>81</b>
3.2.1. INTRODUCTION .....	81
3.2.2. TESTS DES MILIEUX DE LANDY, ACS ET DSM .....	81
<b>3.3. INFLUENCE DU PH</b> .....	<b>86</b>
3.3.1. CULTURE EN FIOLES SUR MILIEU DE LANDY TAMPONNE .....	86
3.3.1.1. En présence de MOPS 100 mM .....	86
3.3.1.2. Autres tampons .....	92
3.3.2. CULTURE EN FIOLES SUR MILIEU DE LANDY A DIFFERENT PH .....	92
3.3.3. EN BREF .....	100
<b>3.4. INFLUENCE DES SOURCES AMINEES SUR LA NATURE DE LA CHAINE LIPIDIQUE DES MYCOSUBTILINES</b> .....	<b>101</b>
3.4.1. INFLUENCE CHEZ B. SUBTILIS ATCC 6633 ET BBG100 .....	101
3.4.2. EN BREF .....	107
<b>3.5. PRODUCTIVITE EN MYCOSUBTILINE ET SOURCES CARBONEES</b> .....	<b>108</b>
<b>3.6. INFLUENCE DU FER SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR B. SUBTILIS ATCC 6633 ET BBG100</b> .....	<b>109</b>
3.6.1. INTRODUCTION .....	109
3.6.2. EFFET D'UN AJOUT .....	109
3.6.3. EN BREF .....	111
<b>3.7. EFFET DU TRANSFERT D'OXYGENE SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE DANS UN SYSTEME DE CULTURE AEREE EN SURFACE RAMOS</b> .....	<b>112</b>
3.7.1. INTRODUCTION .....	112
3.7.2. TRANSFERT DES CONDITIONS DE CULTURE DU SYSTEME DE CULTURE EN FIOLES D'ERLENMEYER AUX FIOLES RAMOS .....	113
3.7.3. MISE EN EVIDENCE D'UNE LIMITATION EN OXYGENE .....	114
3.7.3.1. Sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique .....	114
3.7.3.2. Sur milieu de Landy modifié additionné d'isoleucine .....	117

3.7.4. INFLUENCE DU TRANSFERT EN OXYGENE SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE .....	119
3.7.4.1. Caractérisation des différents niveaux de limitation en oxygène .....	119
3.7.4.2. Effet sur la production en mycosubtiline et surfactine .....	121
3.7.4.3. En bref.....	125
<b>3.8. CONCLUSION .....</b>	<b>126</b>

#### **4. ETUDE DE LA REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE MYCOSUBTILINE PAR *B.***

<b><u>SUBTILIS.....</u></b>	<b>128</b>
-----------------------------	------------

<b>4.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>128</b>
<b>4.2. TRAVAUX PRELIMINAIRES.....</b>	<b>128</b>
4.2.1. EFFET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE .....	128
4.2.2. OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ARN.....	130
4.2.2.1. Kit RNAeasy de Qiagen .....	130
4.2.2.2. Kit Ribopure Bacteria d' Ambion .....	133
4.2.2.2.1. Variation du temps de passage au Mixer1000.....	133
4.2.2.2.2. Test de lyse enzymatique via l'ajout de lysozyme .....	134
4.2.2.2.3. Variation du nombre de cellules.....	136
4.2.2.3. En bref .....	137
4.2.3. CONSTRUCTION DE LA SOUCHE <i>B. SUBTILIS</i> 168 <i>SFP</i> <sup>+</sup> .....	137
4.2.3.1. Justificatif .....	137
4.2.3.2. Obtention du gène <i>sfp</i> issu de la souche <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 .....	137
4.2.3.2.1. Amplification par PCR conventionnelle .....	137
4.2.3.2.2. Tests par restriction .....	138
4.2.3.2.3. Clonage du fragment dans le plasmide pGEM-T Easy .....	140
4.2.3.2.4. Transformation dans la souche <i>B. subtilis</i> 168.....	142
4.2.3.3. Hybridation croisée sur la puce EGT 168 des cibles issues d'ATCC 6633 et 168 <i>sfp</i> <sup>+</sup> .....	143
4.2.3.4. En bref .....	145
<b>4.3. APPORTS DE LA TRANSCRIPTOMIQUE.....</b>	<b>146</b>
4.3.1. GENES REGULES LORS DE LA SYNTHÈSE DE MYCOSUBTILINE ANTEISOC-17 .....	146
4.3.1.1. Régulation précoce .....	146
4.3.1.2. Régulation tardive .....	162
4.3.2. EN BREF .....	164
<b>4.4. ETUDE PRELIMINAIRE DU ROLE DE REGULATEUR DE <i>CSPB</i> CHEZ ATCC 6633 .....</b>	<b>165</b>
4.4.1. HOMOLOGIE DE <i>CSPB</i> ENTRE <i>B. SUBTILIS</i> ATCC 6633 ET 168.....	165

4.4.2. CRYORESISTANCE D'ATCC 6633.....	166
4.4.3. VALIDATION PHYSIOLOGIQUE DU ROLE DE CSPB CHEZ ATCC 6633 .....	167
4.4.3.1. Effet de la température .....	167
4.4.3.2. Détermination du niveau de la régulation .....	169
4.4.3.3. Valorisation des résultats.....	170
4.5. CONCLUSION.....	170

**5. ETUDE DE LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR B.SUBTILIS EN BIOREACTEUR..... 173**

<b>5.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>173</b>
<b>5.2. CULTURES DISCONTINUES .....</b>	<b>174</b>
5.2.1. PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR B. SUBTILIS ATCC 6633 .....	174
5.2.1.1. Culture avec régulation du pH.....	174
5.2.1.2. Cultures sans régulation du pH .....	178
5.2.1.3. En bref .....	179
5.2.2. PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR B. SUBTILIS BBG100 .....	179
5.2.2.1. Culture régulée en pH.....	179
5.2.2.2. Culture non régulée en pH.....	181
5.2.2.3. En bref .....	182
5.2.2.4. Valorisation des résultats.....	182
5.2.3 LIMITATION DU MOUSSAGE LORS DE CULTURES DE B. SUBTILIS BBG100.....	183
5.2.3.1 Systèmes physiques d'élimination ou de limitation de la mousse.....	183
5.2.3.1.1 Réfrigération.....	183
5.2.3.1.2. Dévésiculation .....	183
5.2.3.2. Contrôle de la mousse par ajout d'antimousse .....	184
5.2.3.2.1. Introduction .....	184
5.2.3.2.2. Détermination des concentrations et effets des antimousses.....	184
5.2.3.2.3. Culture de <i>B. subtilis</i> BBG100 en bioréacteur en présence d'antimousse Hodag.....	187
5.2.3.2.4. En bref .....	191
<b>5.3. PROCEDES SEMI-DISCONTINUS A ALIMENTATION EXPONENTIELLE.....</b>	<b>191</b>
5.3.1. INTRODUCTION .....	191
5.3.2. OPERATION A VOLUME CONSTANT .....	192
5.3.3. PRESENTATION DE L'O-EFBC .....	194
5.3.4. MODELISATION ET ASPECTS THEORIQUES .....	196

5.3.4.1. Equations dynamiques du modèle .....	196
5.3.4.2. Relation entre la concentration en biomasse dans le bioréacteur et dans la mousse .....	197
5.3.4.3. Description du débit de mousse débordant.....	197
5.3.5. STRATEGIE D'ESTIMATION DES PARAMETRES .....	198
5.3.5.1 Schéma d'optimisation .....	198
5.3.5.2. Stratégie d'optimisation .....	199
5.3.5.3. Évaluation de concentration en biomasse dans la mousse collectée .....	200
5.3.6. PERFORMANCE DE L'EXTRACTION DES LIPOPEPTIDES.....	201
5.3.7. ÉVALUATION DES PARAMETRES MODELES.....	201
5.3.8. CORRELATION ENTRE LE TAUX DE CROISSANCE SPECIFIQUE MOYEN ET LA PRODUCTIVITE SPECIFIQUE .....	204
5.3.9. EN BREF .....	207
5.3.10. VALORISATION DES RESULTATS .....	208
<b>5.4. PROCEDE DEBORDANT SEMI-DISCONTINU ALIMENTE LINEAIREMENT (O-FBC).....</b>	<b>208</b>
<b>5.5. CONCLUSION .....</b>	<b>211</b>
<b><u>6. CONCLUSION.....</u></b>	<b><u>214</u></b>

<b><u>LISTE DES REFERENCES.....</u></b>	<b><u>217</u></b>
---	-------------------

<b><u>ANNEXES.....</u></b>	<b><u>229</u></b>
----------------------------	-------------------

ANNEXE 1 .....	230
ANNEXE 2 .....	238
ANNEXE 3 .....	247
ANNEXE 4 .....	262
ANNEXE 5 .....	281

## Liste des abréviations

### Genres bactériens :

<i>B. subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
<i>A. niger</i> :	<i>Aspergillus niger</i>
<i>B. cinerea</i> :	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>P. pastoris</i> :	<i>Pichia pastoris</i>
<i>C. albicans</i> :	<i>Candida albicans</i>
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>

### Divers :

CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CM :	Capacité moussante
NRPS :	“Non Ribosomal Peptide Synthetase”
PKS :	“Polyketide Synthase”
GRAS :	“Generally Recognised As Safe”
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ARNtot :	Acides ribonucléiques totaux
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
dNTP :	Désoxynucléotide triphosphate
ORF :	Cadre ouvert de lecture
L- :	Lévogyre
D- :	Dextrogyre
Glc :	Glucose
Ile :	Isoleucine
Val :	Valine

Leu :	Leucine
Thr :	Thréonine
Glu :	Acide glutamique
Gln :	Glutamine
Asp :	Aspartate
Asn :	Asparagine
Taq Pol :	Polymérase thermorésistante de <i>Thermus aquaticus</i>

Méthodes :

RAMOS :	Respiration Activity MOnitoring System
CLHP :	Chromatographie liquide haute performance
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
MALDI-TOF :	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight

Principaux produits Chimiques :

EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétate
MOPS :	Acide 3-[N-morpholino]-propane sulfonique
ODS :	Octadecyl silica
TFA :	Acide trifluoro acétique
DTT :	Dithiothréitol
X-Gal :	5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -galactopyranoside
SSC :	Solution saline de citrate de sodium
BET :	Bromure d'éthidium
TBE :	Tris-borate-EDTA
IPTG :	Isopropyl $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

Unités :

DO :	Unité de Densité Optique
h :	heure
min :	minute
m :	mètre
cm :	centimètre

mm :	millimètre
nm :	nanomètre
mL :	millilitre
μL :	microlitre
v/v :	volume/volume
pH :	potentiel hydrogène
rpm :	rotation par minute
UFC :	unité formant colonie
VVM :	volume d'air par volume de milieu de culture par minute

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

## 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. *BACILLUS SUBTILIS* : ORGANISME MODÈLE DES GRAM<sup>+</sup>

Les micro-organismes appartenant au genre *Bacillus* ont une morphologie bacilliforme et sont le plus souvent rectilignes, à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable, de 0,5 x 1,2 µm jusqu'à 2,5 x 10 µm. Ils sont à Gram positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, aérobies ou aéro-anaérobies, le plus souvent catalase positive et donnant une réponse variable au test de l'oxydase. Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables, les *Bacillus* forment des spores, une seule spore par cellule végétative, souvent très résistantes dans le milieu extérieur. Il est intéressant de noter que ce phénomène de sporulation n'est pas inhibé par l'oxygène. Les *Bacillus* sont des germes de l'environnement dont l'habitat principal est le sol où ils joueraient un rôle dans les cycles du carbone et de l'azote. La résistance des spores et la diversité physiologique des formes végétatives en font des bactéries très ubiquistes que l'on peut isoler du sol, de l'eau de mer, de l'eau douce ou de denrées alimentaires. Deux espèces ont un pouvoir pathogène indiscutable : *B. anthracis* et *B. cereus*. D'autres espèces sont des pathogènes opportunistes notamment pour les individus débilisés. *B. subtilis* (figure 1) n'est certes pas un pathogène, il n'est même pas considéré comme un opportuniste mais a tout de même été isolé, chez l'homme, lors d'endocardites, de pneumonies, de bactériémies, de septicémies ou d'infections oculaires. Il est aussi responsable de quelques rares cas de toxi-infections alimentaires où il a pu être isolé en grand nombre à partir d'aliments altérés (viandes froides, pâtés, farces, pizza, pains complets).

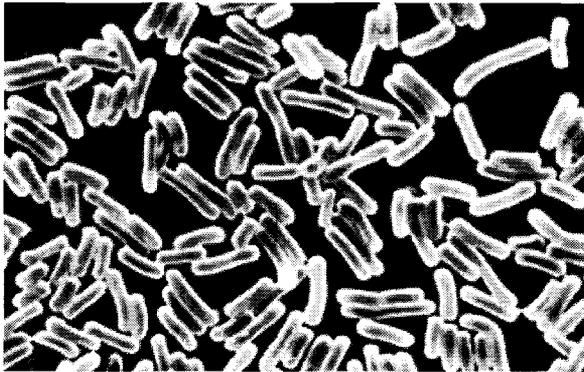


Figure 1 : Image de *B. subtilis* prise au microscope électronique (échelle : 1 cm / 2  $\mu$ m)

Dans le début des années soixante, la découverte de la compétence naturelle de *B. subtilis* a rendu possible son étude génétique alors que cette discipline en était à ses balbutiements. Depuis, « *B. subtilis* est sans conteste considéré comme la bactérie modèle des bactéries à Gram<sup>+</sup> mais aussi comme l'un des organismes les plus étudiés » (Sonenshein *et al.*, 2001). Sa machinerie métabolique et aussi sa capacité à sporuler ont été étudiées comme un modèle des Gram<sup>+</sup> pour établir les bases de la régulation et comprendre les mécanismes de résistance aux antibiotiques et de différenciation cellulaire. Il constitue de ce point de vue un modèle stratégique pour l'étude de bactéries pathogènes telles que *B. anthracis* ou *B. cereus*.

Les *Bacillus* sont réputés pour être difficiles à isoler et à mettre en culture, mais l'espèce *subtilis* présente la capacité de croître assez facilement, jusqu'à atteindre de hautes densités cellulaires, proches de 120 g/L en poids sec. Par conséquent, il a rapidement été considéré comme un candidat à l'industrialisation notamment pour la production d'enzymes telles les protéases et les cellulases, dans l'industrie des détergents, ou encore les amylases, utilisées dans l'industrie du pain. Sa capacité à produire naturellement un large éventail d'antibiotiques, comme la bacitracine, en fait un organisme d'intérêt également pour l'industrie pharmaceutique. La variété natto de *B. subtilis* est également utilisée au Japon pour fabriquer un plat traditionnel à base de soja fermenté.

Toutes ces raisons ont motivé le lancement dans un effort commun, européen et japonais, du séquençage complet du génome de la souche de laboratoire *B. subtilis* 168 (Kunst *et al.*, 1997). Ce fut la première bactérie à Gram positif dont l'intégralité du chromosome était

révélée. De l'accès à cette séquence dépendait la mise au point de nouvelles approches expérimentales dites globales comme par exemple la transcriptomique, décrite plus en avant dans la suite du chapitre. L'analyse bioinformatique de cette séquence d'environ 4 millions de nucléotides a permis de dénombrer quelques 4200 gènes. Parmi eux, 60 % codent des protéines dont les fonctions étaient reconnues de façons putatives. Restaient par conséquent 40 % des gènes pour lesquels aucun indice suffisamment précis n'était disponible quant à leur fonction. Le séquençage complet du génome de *B. subtilis* a donc permis une avancée importante des travaux de recherche et constitue encore un réservoir important d'informations sur l'évolution des génomes et la régulation génique.

## 1.2. LES PEPTIDES NON RIBOSOMAux ET LEUR SYNTHÈSE

La diversité des produits naturels synthétisés par les micro-organismes constitue depuis des décennies un véritable réservoir de molécules. Ces métabolites secondaires ont été lentement façonnés et améliorés pour leurs fonctions biologiques, résultat de millions d'années d'évolution. Ils représentent de nos jours les échafaudages prometteurs pour le développement de composés aux applications très diverses. Cette optimisation peut être envisagée par l'optimisation *in vivo* de la sélectivité des procédés de synthèse ou, plus récemment, par l'introduction par génie enzymatique et par chimie combinatoire de modifications ponctuelles qui permettent l'obtention de dérivés semi-synthétiques à partir des structures existantes (Grunewald et Marahiel, 2006).

Parmi ces produits naturels, les produits peptidiques représentent une sous-classe importante aux applications diverses et à l'affichage thérapeutique prometteur. Ils peuvent être classés en différents groupes selon leurs voies de synthèse. Les antibiotiques, par exemple, sont des agents antimicrobiens synthétisés par voie ribosomale et dont l'activité biologique dépend de leurs modifications post-traductionnelles.

Les peptides non ribosomaux constituent une autre classe répandue de peptides. Ils sont synthétisés par une voie particulière, dite non ribosomale, à l'aide de complexes multienzymatiques de très grandes tailles appelées NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase). Ces enzymes sont remarquables de par leur masse puisqu'elles peuvent atteindre cinq mégadaltons, soit une masse deux fois plus importante que celle des ribosomes.

L'observation récente par microscopie à fluorescence (figure 2) d'une NRPS, la surfactine synthétase, marquée à la Yellow Fluorescent protein (YFP) révèle sa présence de manière diffuse dans le cytoplasme (Straight *et al.*, 2007). Fait remarquable, il semblerait que les NRPS soient visibles en simple microscopie à transmission électronique mais cette observation demande à être vérifiée (Straight *et al.*, 2007).

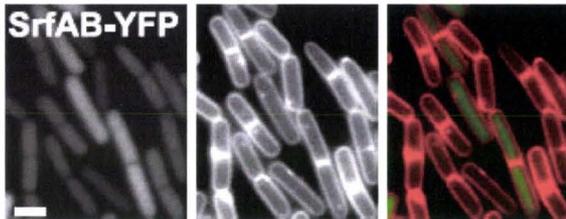


Figure 2: A gauche : localisation par microscopie à fluorescence du méga-complexe protéique SrfAB-YFP dans *B. subtilis* 3610. Au centre : visualisation par microscopie à fluorescence des membrane marquées au TMA-DPH (Molecular Probes, Eugene, OR). A droite : superposition des deux images rendant compte de la diffusion de SrfAB-YFP(en vert) dans le cytoplasme (Straight *et al.*, 2007). Echelle (barre, 1  $\mu$ m)

Dans la synthèse non ribosomale, les NRPS jouent le rôle de matrice, comparable à celui de l'ARN messenger dans la voie classique, et celui d'usine de synthèse, comparable aux ribosomes, aux ARNt et à l'ARNt synthétase. La synthèse d'un peptide d'origine non-ribosomale fait souvent appel à plusieurs NRPS codées par des gènes organisés en opéron. Ces derniers sont organisés par modules. Chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé spécifique dans la chaîne peptidique en cours d'élongation. Les modules sont eux-mêmes subdivisés en domaines. Chaque domaine représente une activité enzymatique particulière. Il existe quatre types de domaines principaux.



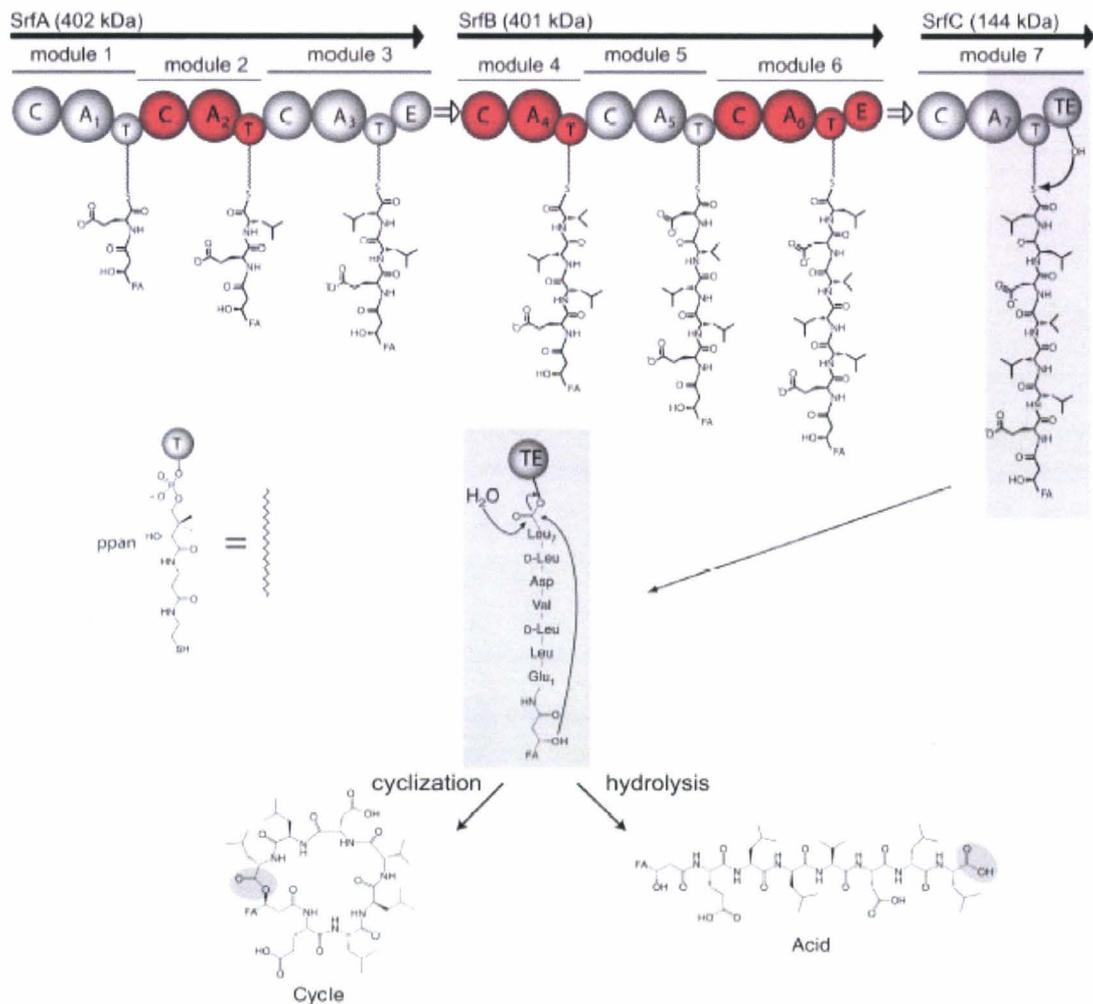


Figure 3: Exemple de synthèse par un complexe de NRPS, la surfactine synthétase (Sieber et Marahiel, 2003). Les 24 domaines, symbolisés par A (adénylation), T (thiolation), C (condensation) et  $T_E$  (thioestérase) sont regroupés en 7 modules appartenant à 3 NRPS distinctes, SrfA, SrfB et SrfC. Le peptide en cours d'élongation est lié aux domaines T de la surfactine synthétase par des bras phosphopantéthéiniques (Ppan)

Il existe trois grands types de synthèse (Mootz *et al.*, 2002). Le premier est la biosynthèse linéaire où il y a colinéarité entre la synthétase et le peptide produit. Cela signifie que l'enchaînement des modules de la synthétase correspond à celui des monomères incorporés dans le produit. Ce type de biosynthèse correspond au cas le plus fréquent. Le second type rencontré est la biosynthèse itérative où certains modules de la synthétase sont

utilisés plus d'une fois lors de la synthèse d'un même peptide. Enfin, le dernier type est la biosynthèse non linéaire où l'agencement des modules de la synthétase est différent de celui des monomères du peptide. On peut également retrouver des monomères incorporés au sein du peptide qui ont une origine autre que celle de la synthétase. Il peut y avoir par exemple, incorporation de parties synthétisées par des domaines de polycétide synthases PKS. Les polycétides sont dérivés de la polymérisation de sous-unités propionyles et acétyles dans un procédé similaire à la synthèse d'acides gras. Les domaines PKS peuvent être présents en amont des premiers domaines NRPS. On obtient alors une synthétase mixte PKS/NRPS comme dans le cas de la mycosubtiline synthétase (Duitman *et al.*, 1999).

Les peptides non ribosomaux présentent un large éventail d'activités biologiques et de propriétés pharmacologiques (Schwarzer *et al.*, 2003). En effet, certains peptides synthétisés par cette voie ont un pouvoir antibiotique antibactérien. Les plus illustres exemples sont la pénicilline et la céphalosporine, (Byford *et al.*, 1997) synthétisées à partir d'un précurseur peptidique non ribosomal commun, le tripeptide-ACV. D'autres substances ont les mêmes propriétés comme la tyrocidine A (Marques *et al.*, 2007), la gramicidine S (Simakova *et al.*, 1985) et la vancomycine (Caillon *et al.*, 1989). La cyclosporine A est quant à elle considérée comme un agent immuno-suppressif (Ryffel *et al.*, 1994). La bléomycine A2 (Muller *et al.*, 1983) et l'épothilone (Tang *et al.*, 2000) montrent des activités cytostatiques permettant d'envisager leur utilisation dans la lutte contre le cancer. La bacillibactine (May *et al.*, 2001), la yersiniabactine (Gehring *et al.*, 1998), la vibriobactine (Keating *et al.*, 2000) et la pyoverdine (Mossialos *et al.*, 2002) ont toutes des propriétés de chélatants du fer. On les appelle des sidérophores. Les iturines et en particulier la mycosubtiline montrent des propriétés antifongiques intéressantes (Besson et Michel, 1989). Une caractéristique importante des peptides non-ribosomaux est d'être non seulement assemblés à partir des 20 acides L-aminés protéogéniques mais aussi à partir de centaines d'autres composés aux structures remarquables tels que des acides gras liés aux extrémités N-terminales, des résidus N-ou C-méthylés, des résidus N-formylés, des éléments hétérocycliques, des acides aminés glycosylés, des acides D-aminés ou des résidus phosphorylés (Sieber et Marahiel, 2005).

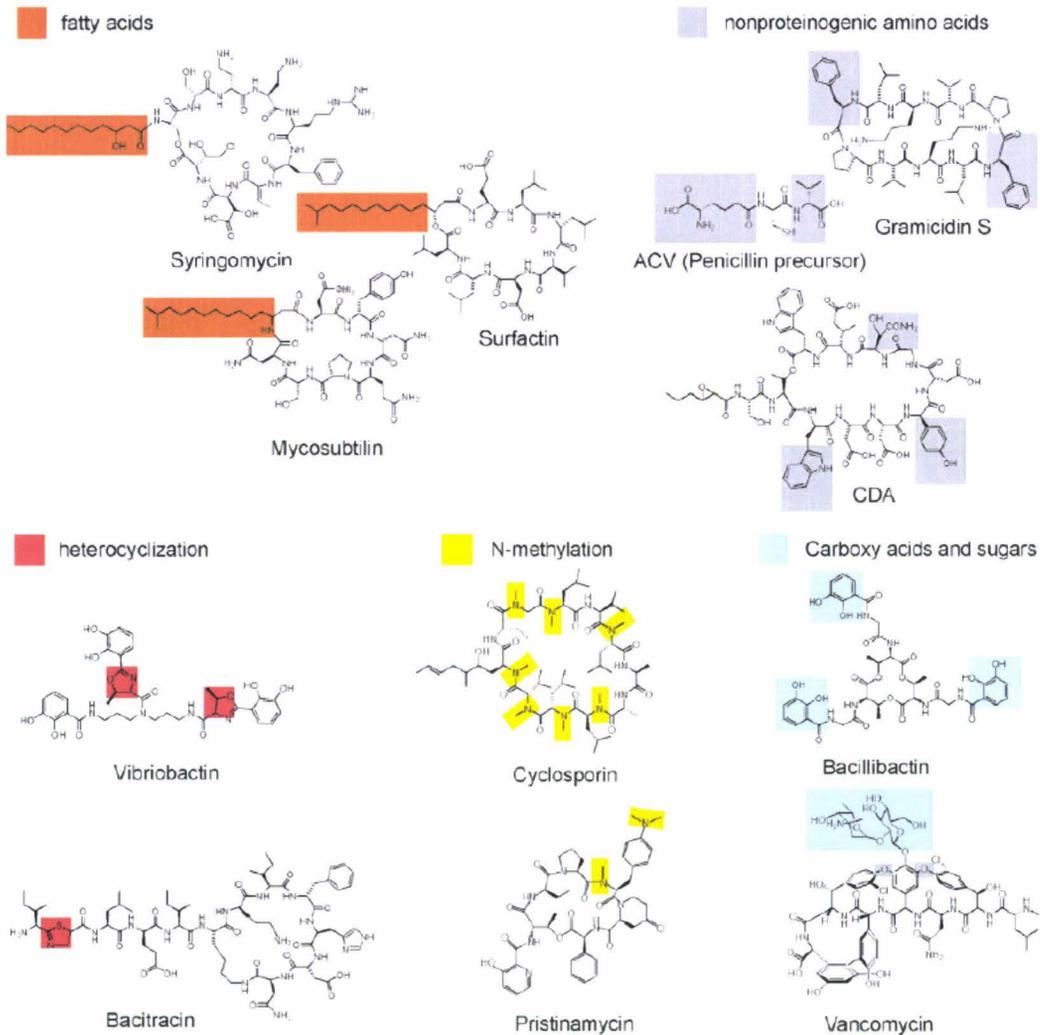


Figure 4: Exemples de structures de peptides naturels synthétisés par la voie non ribosomale (Sieber et Marahiel, 2005)

Des structures choisies de quelques peptides non-ribosomaux sont montrées dans la figure 4. Ces composés ont en commun la forte contrainte stérique imposée à leur structure. Celle-ci assure l'activité biologique car une conformation stéréochimique précise est souvent exigée pour l'interaction avec la cible moléculaire (Kohli *et al.*, 2001).

Ces contraintes peuvent être imposées par un hétérocycle. Dans le cas de la bacitracine, l'élément hétérocyclique permet une complexation cation-dépendante spécifique du groupement phosphate d'un transporteur lipidique de type isoprényle impliqué dans la

synthèse de la paroi bactérienne, menant à une déplétion de ce transporteur et finalement au blocage de la synthèse de la paroi (Toscano et Storm, 1982). Dans le cas de la vancomycine, l'ossature de l'heptapeptide est rigidifiée par une liaison covalente atypique entre deux cycles aromatiques. La conformation remarquable de ce glycopeptide permet ensuite l'établissement de cinq liaisons hydrogènes avec les terminaisons N-acyl-D-Ala-D-Ala des chaînes du peptidoglycane bactérien ce qui inhibe les étapes de transglycosylation et/ou de transpeptidation nécessaire à la synthèse de la paroi (Barna et Williams, 1984). Dans le cas de la mycosubtiline, la contrainte dans la structure est obtenue grâce à la cyclisation de l'heptapeptide et à la présence d'une L-Pro dans le cycle, qui permet notamment au groupe carbonyl de la Ser en position 6 d'interagir avec son propre groupe hydroxyl (Genest *et al.*, 1987). La conformation obtenue permet à ce lipopeptide de s'introduire dans la bicouche lipidique pour la désorganiser en formant des oligomères. Ces derniers sont constitués d'agrégats de lipopeptides, de complexes lipopeptides-phospholipides ou lipopeptides-phospholipides-stéroïdes qui ont la propriété de conduire les ions. Les canaux formés s'élargissent progressivement et entraînent la fuite de composés intracellulaires : cations potassium, nucléotides, protéines, polysaccharides et lipides (Maget-Dana et Ptak, 1990) provoquant la mort de la cellule cible.

### 1.3. LIPOPEPTIDES DE *B. SUBTILIS*

Les lipopeptides de *B. subtilis* sont synthétisés par la voie non ribosomale. Les iturines, les surfactines et les fengycines constituent les trois principales familles de ces hétéropeptides (Schneider *et al.*, 1999) (Bonmatin *et al.*, 2003). La structure générale des lipopeptides est un cycle peptidique de 7 L- et D-acides  $\alpha$ -aminés (iturines, surfactines) ou de huit L- et D-acides  $\alpha$ -aminés (fengycines). Le cycle heptapeptidique est directement lié en  $\beta$  d'une longue chaîne hydrocarbonée par une liaison ester (surfactines) ou une liaison amide (iturines). Le cycle octapeptidique de la fengycine est formé à partir d'un décapeptide par liaison ester interne entre la fonction hydroxyl de l'acide  $\alpha$ -aminé C-terminal, la D-Tyr, et la fonction carboxyl de la D-alloThr. Le décapeptide est lié à son extrémité N-terminale par liaison amide à une chaîne hydrocarbonée  $\beta$ -hydroxylée (Vanittanakom *et al.*, 1986).

La grande diversité des lipopeptides s'exprime par l'incorporation dans leur structure primaire de différents acides aminés et acides gras. Les surfactines peuvent ainsi présenter

ainsi une variété d'homologues de substitution des constituants de la partie heptapeptidique (tableau 1).

Tableau 1: Séquences peptidiques des homologues de surfactine de *B. subtilis*. Les acides aminés de substitution sont en gras

Noms	Acides aminés et position (série D ou L)							Références
	L1	L2	D3	L4	L5	D6	L7	
S (1)	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	1
[Gln1] S	<b>Gln</b>	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	2
[Ala4] S	Glu	Leu	Leu	<b>Ala</b>	Asp	Leu	Leu	3
[Leu4] S	Glu	Leu	Leu	<b>Leu</b>	Asp	Leu	Leu	4
[Ile4] S	Glu	Leu	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	Leu	4
[Val7] S	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	5
[Ile7] S	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	6
[Ile4,7] S	Glu	Leu	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	<b>Ile</b>	7
[Ile2,4,7] S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	<b>Ile</b>	7
[Ile2] [Val7] S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	4
[Val2] [Ile7] S	Glu	<b>Val</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	4
[Val2,7] S	Glu	<b>Val</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	4
[Ile2,4] S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	4

1 (*Kakinuma et al., 1968*); 2 (*Trischman et al., 1994*); 3 (*Peypoux et al., 1994*); 4 (*Bonmatin et al., 1994*); 5 (*Peypoux et al., 1991*); 6 (*Baumgart et al., 1991*); 7 (*Grangemard et al., 1997*)

## 1.4. LA MYCOSUBTILINE : UN LIPOPEPTIDE ITURINIQUE DE *B. SUBTILIS*

### 1.4.1. FAMILLE DES ITURINES

L'isolement des iturines à partir de surnageants de culture de *B. subtilis* remonte aux années 40. Ces iturines avaient été décrites sous divers noms tels que la mycobacilline en 1958 ou l'antibiotique de Raubitschek en 1950 pour désigner en fait l'iturine A dont la composition en acides  $\alpha$ -aminés avait été doublement estimée.

Des études structurales ont permis la distinction de six iturines (tableau 2): la bacillomycine subdivisée en bacillomycine D (*Peypoux et al., 1980*) (*Peypoux et al., 1984*),

F (Peypoux *et al.*, 1985), L (Peypoux *et al.*, 1984), L<sub>c</sub> (Eshita *et al.*, 1995), la mycosubtiline (Walton et Woodruff, 1949) et l'iturine A (Garbay-Jaureguiberry *et al.*, 1978). Notons l'existence d'autres formes mineures, les iturines B, C, D et E et les mycosubtilines B et C.

Tableau 2: Séquences peptidiques des principales iturines et leurs isoformes. BLC, BL, BD et BF représentent les bacillomycines LC L, D et F; IA, l'iturine A; MS, la mycosubtiline. *i* = iso; *a* = anteiso et *n* = normal

Noms	Acides aminés							Acides gras β-aminés majoritaires
	L1	D2	D3	L4	L5	D6	L7	
<b>BLC</b>	Asn	Tyr	Asn	Ser	Glu	Ser	Thr	
<b>BL</b>	Asp	Tyr	Asn	Ser	Gln	Ser	Thr	<i>nC-14, aC-15, iC-15</i>
<b>BD</b>	Asn	Tyr	Asn	Pro	Glu	Ser	Thr	<i>nC-14, nC-16, iC-15</i>
<b>BF</b>	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Thr	<i>iC-15, aC-17, iC-17</i>
<b>IA</b>	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Asn	Ser	<i>nC-14, aC-15, iC-15</i>
<b>MS</b>	Asn	Tyr	Asn	Gln	Pro	Ser	Asn	<i>iC-16, aC-17, iC-17</i>

Les iturines possèdent une structure cyclopeptidique (Delcambe *et al.*, 1977) (Besson *et al.*, 1978b) dont les acides α-aminés de type asparagine, glutamine, thréonine, sérine, proline et tyrosine sont les constituants les plus fréquents. Tous les antibiotiques ituriniques sont caractérisés par une séquence chirale invariable d'acides α-aminés (LDDLLDL) avec un résidu tyrosine en position 2 et un résidu asparagine en position 3. Le cycle peptidique de ces molécules est directement lié à une chaîne d'acide gras β-aminé dont la longueur peut varier de 14 à 17 atomes de carbone. La masse moléculaire de ces antibiotiques varie de 1021 à 1099 daltons.

Les bacillomycines se caractérisent principalement par la présence de la L-thréonine en position 7 accompagnée d'autres spécificités suivant le sous groupe. Ainsi, avons-nous une substitution de l'asparagine 1 par l'acide L-aspartique et la présence d'un deuxième résidu sérine dans la bacillomycine L; de même la bacillomycine D présente un résidu Glu au lieu de Gln dans les autres cas. Ces spécificités sont répertoriées dans le tableau 1. Besson et Michel ont isolé en 1988 des bacillomycines F<sub>b</sub> (C<sub>52</sub>H<sub>81</sub>N<sub>11</sub>O<sub>15</sub>), F<sub>c</sub> (C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>N<sub>10</sub>O<sub>16</sub>) qui diffèrent de

bacillomycine F ou F<sub>a</sub> (C<sub>52</sub>H<sub>82</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>) par la présence de groupements carboxyliques libres. La position de ces modifications n'a pas été déterminée avec exactitude.

La structure de la mycosubtiline a été résolue en 1976 par Peypoux et ses collaborateurs. Une structure corrigée sera ensuite publiée (Peypoux *et al.*, 1986). La mycosubtiline se distingue de l'iturine A uniquement par l'inversion des acides aminés en position six et sept. D'autres composés mineurs sont les mycosubtiline B et C (Besson et Michel, 1990). L'apparition de ces composés minoritaires serait due aux procédures d'isolement de ces molécules; la chaîne latérale de l'asparagine ou de la glutamine pouvant être hydrolysée pour donner de l'acide aspartique et glutamique dans les conditions très acides d'extraction utilisées.

Des dérivés mineurs d'iturines ont aussi été détectés au cours d'autres purifications : elles diffèrent de l'iturine A par le remplacement d'un groupement amide par un groupement carboxylique et vice versa. Il s'agit des iturines B, C (Peypoux *et al.*, 1978) et D (Besson et Michel, 1987). L'iturine E est obtenue quant à elle suite à la méthylation des groupements carboxyliques de ces acides aminés (Besson et Michel, 1987). Un échantillon d'iturine a été appelé iturine A<sub>L</sub> pour sa forte teneur en acides gras à longue chaîne carbonée (Winkelmann *et al.*, 1983).

Les conformations spatiales de iturine A (Genest *et al.*, 1985), de la mycosubtiline (Genest *et al.*, 1987) et de la bacillomycine L (Volpon *et al.*, 1999) (Volpon *et al.*, 2007) en solution ont été étudiées par RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) à deux dimensions et par modélisation. La structure de l'iturine A est stabilisée par 2 coudes β qui la rendent rigide, particulièrement dans la région de la L-Pro<sub>5</sub>-D-Asn<sub>6</sub>. Ces coudes β impliquent des liaisons hydrogènes entre le CO de la L-Gln<sub>4</sub> et les NH de la Ser<sub>7</sub> et de l'acide gras β-aminé. Les chaînes latérales des acides aminés (celle de la D-Tyr spécialement) ont un grand degré de liberté, ce qui permet des interactions avec l'environnement (Genest *et al.*, 1985) (Marion *et al.*, 1986). Dans le cas de la mycosubtiline, le cycle peptique est plutôt rigide dans la région de la L-Pro<sub>5</sub> et stabilisé par un équivalent du coude γ (C<sub>7</sub> bend), ce qui permet au groupe carbonyl de la Ser<sub>6</sub> d'interagir avec son propre groupe hydroxyl (Genest *et al.*, 1987). La simple inversion des deux derniers acides α-aminés de l'iturine A (Ser<sub>6</sub>-Asn<sub>7</sub>) entraîne une conformation différente de la mycosubtiline (Asn<sub>7</sub>-Ser<sub>6</sub>) (figure 5).

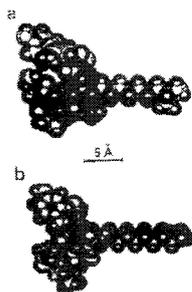


Figure 5 : Modèles spatiaux de la mycosubtiline (a) et de l'iturine A (b) (Maget-Dana, 1994)

Les études de modélisations moléculaires réalisées dans le cadre de la thèse de Hbid en 1996 montrent que ces deux molécules présentent une structure en “cuvette à bord plat” dans laquelle la tyrosine est toujours dégagée vers l’extérieur du cycle et l’asparaginy-3, dans le même sens que l’acide gras  $\beta$ -aminé. De plus, concernant la mycosubtiline, la proline<sup>5</sup> et la sérine<sup>6</sup> sont dans le plan de la cuvette. Les asparaginy-1 et 7 ainsi que la glutaminy-4 sont sur le bord mais orientés vers l’extérieur de la cuvette. Chez l’iturine A, les groupements asparaginy-1, glutaminy-4 et séryl-7 sont orientés dans le sens opposé à l’acide gras  $\beta$ -aminé; la proline<sup>5</sup> reste dans le plan du squelette peptidique et l’asparagine<sup>6</sup> est orientée dans le même sens que l’acide gras  $\beta$ -aminé. Malgré la structure semblable en “cuvette à bord plat” de ces deux iturines, le cycle peptidique de la mycosubtiline est plus dilaté par rapport à celui de l’iturine A. Ces différences semblent n’avoir aucun effet sur les activités biologiques, hémolytique et antifongique, des deux molécules mais favoriseraient une meilleure interaction de la mycosubtiline avec la surfactine.

#### 1.4.2. PROPRIETES DES ITURINES

Les lipopeptides appartenant à la famille des iturines présentent les propriétés caractéristiques des composés amphiphiles. Les activités biologiques, physico-chimiques, de surface et interfaciales sont étroitement liées à l’organisation de ces molécules en micelles telles que cela a été décrit pour la surfactine (Osman *et al.*, 1998).

#### 1.4.2.1. PROPRIETES TENSIOACTIVES ET MOUSSANTES

Mis en solution aqueuse, les lipopeptides s'agrègent spontanément pour former des micelles dans lesquelles la partie polaire est exposée à l'eau. Ces molécules agissent comme des surfactants, elles diminuent la tension superficielle des solutions aqueuses suite à leur adsorption à l'interface air- eau où elles forment une monocouche. Peu de données sont disponibles sur la mycosubtiline, en revanche, la surfactine et aussi l'iturine A ont été largement étudiées (Maget-Dana *et al.*, 1992). Les paramètres de surface des lipopeptides varient peu avec la température mais ils sont largement affectés par le pH de la solution. La présence de sel dans la phase aqueuse influence également ces paramètres, par exemple le NaCl diminue la CMC (Thimon *et al.*, 1992). Des études ont été menées sur la capacité des lipopeptides à produire des mousses. Par exemple, à longueur de chaîne lipidique égale, la surfactine forme une mousse plus dense que l'iturine A mais cette dernière assure une meilleure stabilité de la mousse (Razafindralambo *et al.*, 1998).

Les propriétés de surface des iturines sont moins remarquables que celle de la surfactine. En effet, la tension interfaciale à la CMC atteint la valeur 27 mN/m pour la surfactine alors qu'elle approxime 50 mN/m pour les iturines (tableau 2). Les surfactines forment aussi plus facilement des micelles avec une valeur de CMC de 9  $\mu\text{M}$ .

Tableau 2: Propriétés interfaciales des antibiotiques ituriniques comparées à celles de la surfactine (Thimon *et al.*, 1992)

Lipopeptides	<sup>(1)</sup> $\gamma_{\text{CMC}}$ (mN/m)	<sup>(2)</sup> CMC (25°C) ( $\mu\text{M}$ )
<b>Surfactine</b>	27*	9
<b>Iturine A</b>	54,5	43
<b>Iturine C</b>	49,5	80
<b>Mycosubtiline</b>	55	37
<b>Bacillomycine L</b>	46	160
<b>Bacillomycine D</b>	53	170
<b>Bacillomycine F</b>	50,5	27

<sup>(1)</sup> Tension interfaciale à la concentration micellaire critique; <sup>(2)</sup> concentration micellaire critique.

Des effets de synergie entre iturines et surfactine ont été reportés. Par exemple la possibilité de formation de micelles mixtes entre l'iturine A et la surfactine, en l'absence de cations minéraux, améliorerait les interactions entre la membrane érythrocytaire et l'iturine A (Thimon *et al.*, 1992).

#### 1.4.2.2. PROPRIETES BIOLOGIQUES

##### 1.4.2.2.1. Activité antifongique

Des trois familles de lipopeptides, ce sont les iturines qui présentent le plus grand spectre d'activité antifongique. Elle agit aussi bien sur les champignons filamenteux que sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Besson *et al.*, 1979) (Besson et Michel, 1989) (Latoud *et al.*, 1990).

Le mécanisme d'action des iturines proposé est le suivant: après avoir atteint la membrane cytoplasmique de la cellule cible, elles s'y introduisent et désorganisent la bicouche lipidique en activant les phospholipases *in situ*. Ces lipopeptides forment alors des oligomères (agrégats de lipopeptides ou complexes lipopeptides-phospholipides ou lipopeptides-phospholipides-stérols) conducteurs d'ions. Les pores formés vont s'élargir progressivement et vont entraîner la fuite de cations potassium ( $K^+$ ) intracellulaires, de nucléotides, de protéines, de polysaccharides et de lipides (Latoud *et al.*, 1987) (Maget-Dana et Ptak, 1990).

La présence du résidu D-Tyrosyl en position 2 des iturines joue un rôle important puisqu'une méthylation de ce résidu diminue drastiquement leur activité biologique de même que leur effets sur des membranes modèles (Harnois *et al.*, 1989). Le tableau 3 présente une comparaison des CMI et QMI pour différents lipopeptides de *B. subtilis* et le tableau 4 présente ces mêmes activités pour des homologues différents d'iturine A.

Tableau 3: Comparaison des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différentes iturines vis-à-vis de *S. cerevisiae* (Thimon et al., 1992)

Lipopeptides	CMI vis-à-vis de <i>S. cerevisiae</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Iturine A</b>	20
<b>Mycosubtiline</b>	8
<b>Bacillomycine L</b>	60
<b>Bacillomycine F</b>	10
<b>Bacillomycine D</b>	250

Tableau 4: Quantité minimale inhibitrice (QMI) des homologues d'iturine A vis-à-vis de *S. cerevisiae* NCYC 366 (Hbid, 1996)

Homologues de lipopeptides	QMI vis-à-vis de <i>S. cerevisiae</i> ( $\mu\text{g}$ )
<b>Iturine A nC-14</b>	20
<b>Iturine A iC-15</b>	15
<b>Iturine A iC-16</b>	5
<b>Iturine A nC-16</b>	3
<b>Iturine A aiC-17</b>	1

Le tableau 3 montre que la mycosubtiline est le lipopeptide iturinique qui a le pouvoir antifongique le plus important. La CMI de la mycosubtiline vis-à-vis de *S. cerevisiae* atteint 8  $\mu\text{M}$ . Une étude sur l'effet de la longueur de la chaîne et de l'isomérisation des iturines A montre que l'activité antifongique est d'autant plus élevée que la chaîne est longue. De plus, il semblerait que l'isoforme nC-16, soit plus active que l'isoforme isoC-16.

#### 1.4.2.2.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est restreinte pour les iturines à un petit nombre de souches: *Micrococcus luteus* et *Sarcina lutea*. La lyse des propoplastes de ces bactéries est accentuée en présence d'EDTA mais inhibée avec du  $\text{MgCl}_2$ . La méthylation des groupements aspartyl de la bacillomycine L provoque une activité lytique non observée naturellement (Besson et al., 1978a) (Peypoux et al., 1979).

## 1.4.2.2.3. Activité hémolytique

Les iturines possèdent une importante activité hémolytique. Cet effet hémolytique est fortement inhibé par la présence de cholestérol libre ou inclus dans les liposomes de phosphatidylcholine-cholestérol, ce résultat est dû à l'association de l'antibiotique aux liposomes (Besson *et al.*, 1989). La baisse de cette activité est aussi observée lorsque l'hémolyse a lieu dans un plasma contenant du dextran à haut poids moléculaire; de même lorsque la tyrosine des iturines est substituée, on constate une diminution d'un facteur dix de cette activité. Par contre, l'ajout de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) à la suspension d'érythrocytes favorise l'hémolyse à hauteur de 20 % (Latoud *et al.*, 1986).

L'activité hémolytique de l'iturine A et son interaction avec les membranes d'érythrocytes sont améliorées en présence de surfactine. La modification de ces propriétés serait due à la formation de micelles mixtes. Ce type de complexe est facilement généré lorsque les deux lipopeptides se trouvent dans des solutions aqueuses en absence de cations minéraux (Thimon *et al.*, 1992) (Maget-Dana *et al.*, 1992). Le tableau 5 présente une comparaison des activités hémolytiques de différentes iturines de *B. subtilis* et le tableau 6 présente ces mêmes activités pour des homologues différents d'iturine A.

Tableau 5: Comparaison des concentrations donnant 100% d'hémolyse (valeurs calculées pour une suspension d'érythrocytes de  $2,5 \cdot 10^6$  cellules/ml) (Quentin *et al.*, 1982) (Besson *et al.*, 1989)

Iturines	Concentration provoquant 100% d'hémolyse ( $\mu\text{g/mL}$ )
Iturine A	25
Mycosubtiline	7,5
Bacillomycine L	15
Bacillomycine F	ND
Bacillomycine D	30

Tableau 6: Concentration des homologues d'iturine A et de surfactine donnant 50% d'hémolyse (Hbid, 1996)

Homologues d'iturine A	Conc. donnant 50% d'hémolyse ( $\mu\text{M}$ )
Iturine A nC-14	26
Iturine A iC-15	20
Iturine A iC-16	15
Iturine A nC-16	14
Iturine A aiC-17	9

La mycosubtiline a la meilleure activité hémolytique puisque seulement 7,5 µg/mL sont nécessaires pour provoquer 100% d'hémolyse. Les tests menés avec les homologues d'iturine A montrent que la longueur de la chaîne carbonée joue un rôle important dans l'activité hémolytique.

## 1.5. SYNTHÈSE DE LA MYCOSUBTILINE CHEZ *B. SUBTILIS*

### 1.5.1. LA MYCOSUBTILINE SYNTHÉTASE : UNE ENZYME MULTIFONCTIONNELLE HYBRIDE

La synthèse de mycosubtiline est accomplie par la mycosubtiline synthétase, MycS, une enzyme hybride PKS/NRPS. L'opéron codant pour MycS a été identifié et séquencé chez *B. subtilis* ATCC 6633 (Duitman *et al.*, 1999). Cet opéron, large de 38 kb, comprend 4 cadres ouverts de lecture (ORFs): *fenF*, *mycA*, *mycB* et *mycC*. Il est encadré par une séquence "terminateur" située à 685 bp en amont du premier ORF (Aron *et al.*, 2007) et une autre 71 bp en aval du dernier ORF (*mycC*). Comme dans la plupart des opérons, les régions intergéniques des 4 ORFs contiennent chacune une séquence de Shine-Dalgarno. Le premier ORF de l'opéron de la mycosubtiline, *fenF*, code pour une protéine de 45,2 kDa similaire à une malonyl-CoA transacylase (ou acyltransférase). FenF a pour fonction de charger sur le domaine ACP2 le motif malonate nécessaire à l'élongation du lipopeptide. Les autres ORFs, *mycA*, *mycB* et *mycC* codent pour des protéines ayant des masses molaires respectives de 449,3 kDa, 612,3 kDa et 297,9 kDa. Comme le montre la figure 6, sept modules d'activation d'acides aminés sont identifiés: un module dans la sous-unité MycA de la mycosubtiline synthétase, quatre modules dans MycB et deux modules dans MycC. Les modules Tyr, Asn et Ser contiennent des domaines d'épimérisation E, ce qui confère une configuration D- aux acides aminés qui y sont activés.

Myc A présente une structure fonctionnelle remarquable faisant de lui le premier exemple d'une enzyme naturelle hybride d'acide gras synthétase, d'aminotransférase et de peptide synthétase (Duitman *et al.*, 1999). En effet, le domaine KSD présente 53% d'homologie avec les β-cétoacyl synthétases. Ce domaine est suivi d'un domaine AMT, présentant 54% d'homologie avec les glutamate-semialdéhyde aminotransférases.

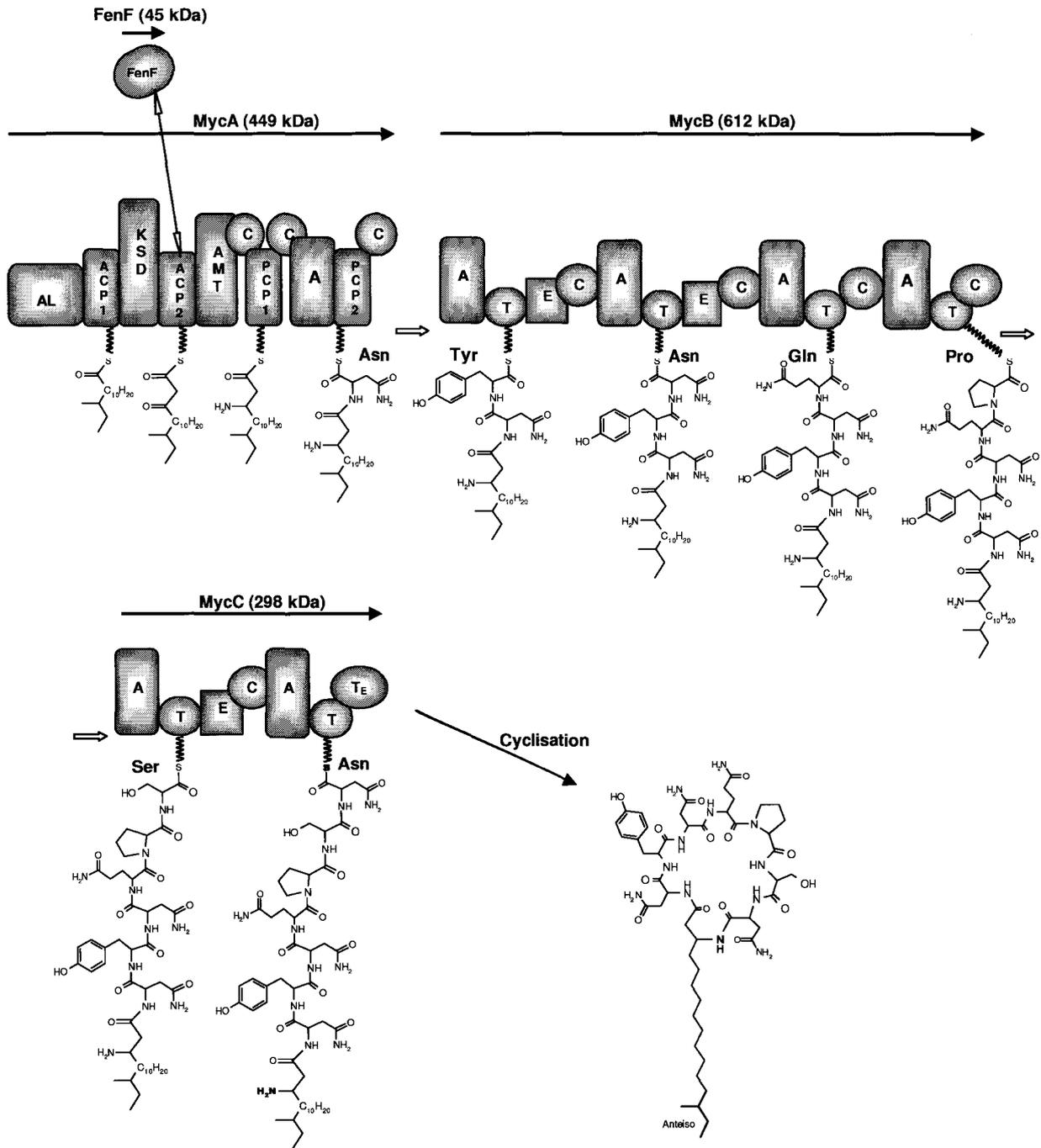


Figure 6: Biosynthèse de mycosubtiline par la mycosubtiline synthétase MycS. Le domaine FenF est une acyltransférase. Les 11 domaines de MycA sont symbolisés par AL (acyl ligase), ACP (acyl carrier protein), KS (ketide synthase-docking), AMT (amino-transférase), C (condensation), PCP (peptidyl carrier protein) et A (adénylation). Les 21 domaines de MycB et MycC sont symbolisés par A (adénylation), T (thiolation), C (condensation) et T<sub>E</sub> (thioestérase). Le peptide en cours d'élongation est lié aux domaines T de la mycosubtiline synthétase par des bras phosphopantéthéiniques (Ppan)

Le domaine AL présente 49% de similarité avec les acyl-CoA ligases des longues chaînes d'acides gras et possède un site de fixation d'ATP. Il fonctionne de pair avec le domaine ACP1. Il permettrait l'activation de l'acyl puis le chargement d'un acyl-adénylate sur le thiolate du bras phosphopantéthéinique du domaine ACP1. Le chargement de l'acyl semblerait ne pas dépendre de la longueur de sa chaîne carbonée lorsque celle-ci est comprise entre C-10 et C-16 (Hansen *et al.*, 2007) ouvrant la voie au développement d'analogues plus actifs. Aucune donnée n'est encore disponible sur la spécificité du chargement d'ACP1 en fonction de l'isomérisation, *-n*, *iso*, ou *anteiso*, de la chaîne d'acyl.

Les domaines ACP1 et ACP2 présentent 45% de similitude avec les protéines porteuses de groupement acyl, ils contiennent tous deux un site de fixation du cofacteur 4'-phosphopantéthéine. Les acyltransférases impliquées dans la synthèse des acides gras opèrent généralement selon un mécanisme complexe de type ping-pong bi-bi. Partant de l'hypothèse où FenF opèrerait de même, des études récentes de cinétiques enzymatiques ont permis de mieux appréhender les spécificités entre FenF, les différents sites de fixations d'acyl de MycA, à savoir ACP1 et ACP2, et le malonyl-CoA ou différents analogues du malonyl-CoA (Aron *et al.*, 2007).

Ces études montrent que FenF charge de façon très spécifique le malonyl-CoA sur les domaines ACP, sans toutefois distinguer réellement ACP2 d'ACP1. Ce manque de spécificité ouvrirait des perspectives pour le développement d'analogues plus actifs. Il est à noter que le rôle jusque-là inexplicé du segment D du domaine PKS pourrait être lié à la régulation du temps de transfert du malonyl sur ACP2 mais ce n'est à ce stade qu'une hypothèse (Aron *et al.*, 2007).

Le domaine KS assure la condensation de l'acyl thioester et du malonyl thioester portés par les domaines ACP1 et ACP2. L'activité  $\beta$ -cétosynthase du domaine KS permet l'obtention d'un  $\beta$ -cétos acyl thioester porté par le bras phosphopanthéinique du domaine ACP2. Les domaines KS et ACP2 de MycA constituent dans une ébauche de module PKS puisque l'activité acyltransférase présente dans un module PKS n'est pas présente.

Contrairement à la synthèse des acides gras classiques, le  $\beta$ -cétos acyl thioester n'est pas converti en acide gras après réduction et hydratation. Il est converti en  $\beta$ -amino acyl grâce au domaine AMT, présentant 54% d'homologie avec les glutamate-semialdéhyde aminotransférases. En raison de la faible spécificité du domaine AMT pour son substrat, il représente là-encore un bon candidat pour des modifications génétiques dans la perspective de synthétiser des molécules semisynthétiques plus actives (Aron *et al.*, 2005). Le domaine de condensation qui suit AMT permet de fixer le  $\beta$ -amino acyl par liaison thioester sur le bras phosphopanthéinique du domaine PCP1.

Pour finir, les domaines C en position 8, A et PCP2 constituent le module peptide synthétase ou NRPS de MycA. Ce module permet l'incorporation de la L-asparagine.

### 1.5.2. SYNTHÈSE DU MOTIF D'ACIDES GRAS

La prédominance des acides gras constitutifs branchés C-15 et C-17 est montrée chez *B. subtilis* dès les années 60. Des études ultérieures (Kaneda, 1967) ont permis la découverte de trois autres acides gras branchés: *i*C-14, *i*C-16, et *ai*C-17.

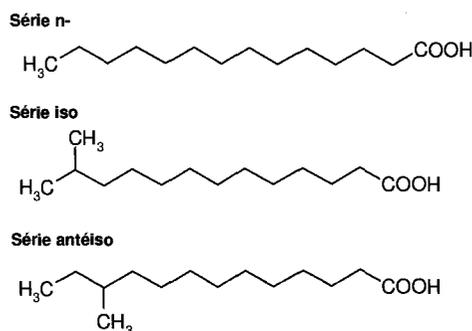
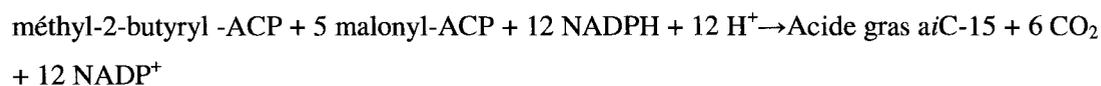


Figure 7: Séries des isoformes d'acides gras n, iso et anteiso. Exemples donnés pour l'acide gras  $C_{14}H_{28}O_2$ .

Des analyses ont montré que les acides gras saturés *iso* et *anteiso* (figure 7) représentent 60 à 90% des acides gras totaux de *B. subtilis* (Bishop *et al.*, 1967). Dans la majorité des cas, la synthèse *de novo* des acides gras consiste en la condensation répétée du malonyl-ACP avec l'acétyl ACP par la palmitate ou l'acide gras synthétase ; le produit final étant l'acide palmitique lorsque le cycle est répété six fois et que le motif élémentaire de la synthèse est un acétyl-ACP.

Chez *B. subtilis*, les motifs élémentaires appelés chaînes initiatrices de la palmitate synthétase sont plutôt des esters à courtes chaînes d'acyl-ACP branchés, tels que l'isobutyryl, l'isovaléryl et le méthyl-2-butyryl (Kaneda, 1973). Le malonyl-ACP joue le rôle d'élongateur de la chaîne carbonée et le NADPH de cofacteur donneur d'électrons. Avec comme motif élémentaire le méthyl-2-butyryl -ACP, l'équation globale de cette réaction peut s'exprimer comme suit:



L'isobutyryl-CoA, l'isovaléryl-CoA et le méthyl-2-butyryl-CoA proviennent de la transformation de l' $\alpha$ -cétoisovalérate, l' $\alpha$ -cétoisocaproate, et le L- $\alpha$ -céto- $\beta$ -méthylvalérate sous la catalyse d'une  $\alpha$ -cétoisovalérate déshydrogénase. Ces composés intermédiaires dérivent de la synthèse *de novo* soit de l'apport exogène respectif de la valine, de la leucine et de l'isoleucine. Nous discuterons dans la suite du travail de l'importance de ce carrefour métabolique pour l'obtention des mycosubstines branchées, particulièrement pour l'isoforme *anteiso*C-17.

Les facteurs environnementaux peuvent affecter le profil des acides gras synthétisés chez *B. subtilis* et la proportion relative des différentes séries d'acides gras peut varier suivant l'espèce (Kaneda, 1968) (Kaneda et Smith, 1980). L'ajout d'un certain nombre de substrats peut modifier les proportions d'acides gras dans la cellule (tableau 7).

Tableau 7 : Différents types de substrat (acide aminés,  $\alpha$ -céto acides, acides à courte chaîne et autres) qui permettent d'augmenter, par ajout dans un milieu de culture standard, les proportions naturelles des séries d'acides gras constitutifs de *B. subtilis* (indiqué en %) (Kaneda, 1966)

	<i>iso</i> C14 <i>iso</i> C-16 (14%)	<i>iso</i> C-15 <i>iso</i> C-17 (21%)	<i>anteiso</i> C-15 <i>anteiso</i> C-17 (57%)	<i>n</i> C-14 <i>n</i> C-16 (8%)	<i>n</i> C-15 <i>n</i> C-17 (<1%)
<b>Acide aminé</b>	L-Valine	L-Leucine	L-Isoleucine L-thréonine	L-Norvaline	L-Norvaline L- $\alpha$ -cétobutyrate
<b><math>\alpha</math>-Céto acide</b>	$\alpha$ -Céto isovalérate	$\alpha$ -Céto isocaproate	L- $\alpha$ -Céto méthyl valérate	$\alpha$ -Céto valérate	$\alpha$ -Céto butyrate
<b>Acide à courte chaîne</b>	Isobutyrate	Isovalérate	D- $\alpha$ - Méthylbutyrate	n-Butyrate	Propionate n- valérate

Outre les trois précurseurs d'acides gras précités, un certain nombre d'acides gras à chaînes courtes ( $C_3$  à  $C_6$ ) pourraient servir à l'initiation "artificielle" des acides gras à plus longue chaîne (Kaneda, 1963).

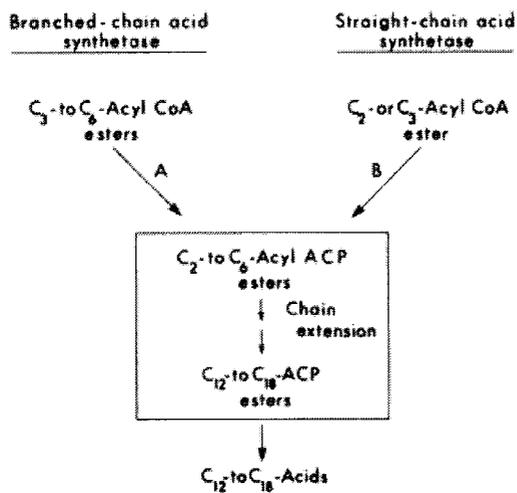


Figure 8 : Voies métaboliques de deux acides gras synthétase. A / catalyse opérée par l'acyl-CoA-ACP transacylase et B / catalyse opérée par l'acétyl-CoA-ACP transacylase (Kaneda, 1977)

Le produit final, la nouvelle chaîne d'acide gras libre formée, serait relâché dans le milieu par l'ACP suite à une hydrolyse enzymatique. La différence majeure entre les synthétases d'acides gras branchés et celles d'acides gras linéaires réside dans leur spécificité face à l'initiateur de la chaîne catalysé par la transacylase acyl-CoA-ACP. La première préfère les esters d'acyl-CoA de trois à six carbones, tandis que la seconde utilise les esters d'acyl-CoA de deux à trois carbones. La figure 8 schématise ces deux voies de synthèse d'acides gras saturés par leur synthétase respective (Kaneda, 1977). La figure 9 résume les principaux éléments et facteurs nécessaires à la biosynthèse des acides gras branchés. Les facteurs principaux affectant les proportions relatives des séries d'acides gras branchés peuvent donc être classés en 3 catégories:

- i. L'activité relative face aux trois précurseurs de chaînes d'acides gras de l'acide gras synthétase au niveau de l'étape C.
- ii. La disponibilité relative des précurseurs de chaînes d'acides gras dans les trois voies, endogène (voie A<sub>1</sub>) et exogènes (voies A<sub>2</sub> et D).
- iii. La quantité des élongateurs de chaînes ("donneur de C<sub>2</sub>" à l'étape C).

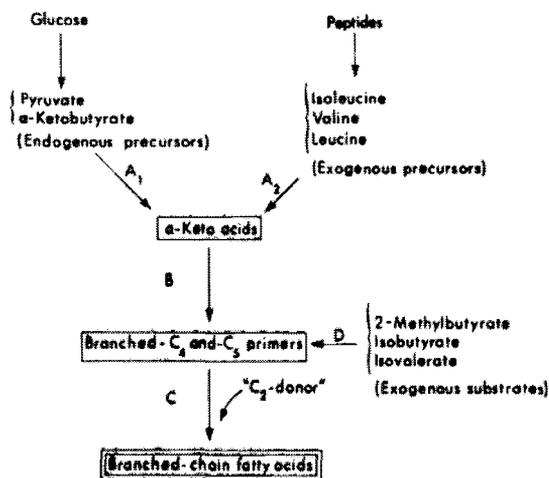


Figure 9 : Précurseurs et voies de biosynthèse d'acides gras branchés (Kaneda, 1977)

D'autres facteurs environnementaux comme la température affectent les proportions relatives des séries d'acides gras branchés chez *B. subtilis*. Il est connu que lors d'un choc

thermique par le froid, la membrane plasmique bactérienne se rigidifie. Pour éviter de perturber la fonction de transport de la membrane, *B. subtilis* s'adapte en modifiant la composition lipidique de sa membrane. Cette adaptation se traduit principalement par l'augmentation de la proportion des acides gras saturés branchés *anteiso*C-15 et *anteiso*C-17 au détriment des isoformes *iso* (Klein *et al.*, 1999).

A ce titre, et pour les raisons évoquées sur la figure 9, une source exogène d'isoleucine incorporée dans le milieu de culture permet à *B. subtilis* de mieux résister au froid (Klein *et al.*, 1999). De plus, des analyses transcriptomiques (Beckering *et al.*, 2002) (Kaan *et al.*, 2002) ont mis en évidence, lors de choc froid, la surexpression de gènes codant pour des petites protéines, appelées protéines de choc froid ou CSP, plus particulièrement CspB et CspC. Il s'agit en fait de protéines (Graumann et Marahiel, 1999) capables de se fixer sur l'ARNm. Elles interviennent dans la régulation de la traduction en stabilisant les ARNm et en empêchant la formation de structures secondaires. Une hypothèse intéressante découlant du travail de Klein *et al.*, 1999 serait qu'elles pourraient être impliquées dans la stabilisation des ARNm des enzymes impliquées dans les voies de synthèse et de dégradation des acides aminés branchés.

## 1.6. PRODUCTION D'ITURINE

Aucune étude dédiée à la production de mycosubtiline n'était encore référencée au début de ce travail. En effet, les études sur la production de lipopeptides par *B. subtilis* ont été principalement menées sur la surfactine. Cependant, quelques groupes ont travaillé sur la production d'iturines. Les études entreprises par Ohno et ses collaborateurs en 1993 ont montré l'importance de la température et de l'apport en oxygène dans les premières heures de culture sur la production d'iturine par *B. subtilis* NB22. En effet, le changement de la température de 30°C à 25, 37, 42 ou 48°C durant le premier jour de culture, de même que la diminution de l'aération par modification de la fermeture des fioles de culture réduisent drastiquement la quantité totale d'iturine produite. La culture effectuée à température constante à 30°C dans une fiole fermée avec une bourre d'ouate est celle qui donne la meilleure production d'iturine. Selon ces chercheurs, la déficience en oxygène dissous après ce premier jour de culture n'a pas d'influence sur la production d'iturine. Les travaux de Hbid *et al.* ont montré en 1996 qu'une agitation plus élevée lors d'une culture en fermenteur de

*B. subtilis* S499, en présence de *n*-dodécane, permettait une amélioration de la production d'iturine. Ils en ont conclu à l'utilité de l'oxygène.

Outre ces paramètres physiques et physico-chimiques, la production d'iturine est largement tributaire de la composition du milieu de culture (Besson *et al.*, 1987) (Sandrin *et al.*, 1990). L'utilisation d'une variété de sources de carbone a permis d'identifier le glucose, le fructose et le mannitol comme étant les meilleures sources carbonées (Besson *et al.*, 1987). Sandrin *et al.*, 1990 montrent que la production conjointe de surfactine et d'iturine dépend du milieu de culture mais aussi des souches utilisées. Les souches de *B. subtilis* testées dans ce travail sont les suivantes : ATCC 21332, ATCC 6633, ATCC 10707, NCIB 8872, IP 5265, IP 164, IM 1005, IM 2410, A 14, LL-Suka 2Bs, 443, fungocin et S499. Les résultats montrent par exemple que certains acides aminés comme l'acide L-glutamique, la L-proline, la L-valine, la L-glutamine sont de bons substrats pour la production d'iturine A par *B. subtilis* S499 (Sandrin *et al.*, 1990). En revanche, la L-isoleucine, le L-tryptophane et la L-lysine ne favorisent pas la biosynthèse d'iturine A par S499. D'autres auteurs complètent ce travail en montrant qu'un milieu de culture avec une source d'azote organique, une concentration élevée en peptone, en magnésium et en manganèse, du sucrose, une température de 30° C, un pH compris entre 6,5 et 7 et une bonne aération du milieu de culture sont les meilleures conditions pour la production de lipopeptides par la souche *B. subtilis* S499 (Jacques *et al.*, 1999). D'autres auteurs préconisent un taux d'aération de 0,1 vvm (volume d'air par volume de milieu de culture par minute), une température de 30°C, un rapport glucose/polypeptone situé entre 0,3 et 0,4 afin d'optimiser la synthèse d'iturine par une souche de *B. subtilis* non référencée (Phae et Shoda, 1991).

Des modifications sur les proportions d'homologues de bacillomycine F et L ont pu être obtenues en remplaçant uniquement la source d'azote du milieu de Landy par d'autres acides aminés (Chevanet *et al.*, 1986) (Besson et Hourdou, 1987). Besson *et al.* ont étudié en 1992 les proportions d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés incorporés dans un composé lipopeptidique non déterminé en fonction de différentes conditions d'ajout d'acides aminés branchés. Ces auteurs ont montré que lors de la biosynthèse de ce composé lipopeptidique par ATCC 6633, la présence de valine permettait d'augmenter la proportion d'acide gras  $\beta$ -hydroxylés *iso* pairs, la présence d'isoleucine celle d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés *anteiso* impairs

(particulièrement l'homologue C-15) et la présence de leucine celle d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés *iso* impairs. Un travail similaire avait été réalisé par d'autres auteurs (Hourdou *et al.*, 1989).

Tout procédé biologique de production de composés tensioactifs moussants à l'échelle du bioréacteur aéré et à agitation mécanique est rendu compliqué à cause du moussage qui occasionne diverses difficultés et notamment des pertes importantes de volume réactionnel. Une stratégie intéressante consiste à récupérer la mousse qui a débordé dans des collecteurs de fractions. Ce type de dispositif est refroidi afin de favoriser le retour à l'état liquide des mousses et ainsi limiter le volume de collecte. Ce processus a été employé par différents auteurs (Cooper *et al.*, 1981) (Neu et Poralla, 1990) et a permis l'extraction en continu des tensioactifs grâce au débordement de mousse. En 2001, Davis et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'agitation sur la production de surfactine par *B. subtilis* et ont atteint un taux d'extraction de 100% mais avec comme contrepartie une perte élevée et non contrôlée de volume de culture (Davis *et al.*, 2001).

## 1.7. DOMAINES D'APPLICATION POTENTIELLE DES ITURINES

### 1.7.1. EN AGRO-ALIMENTAIRE ET VETERINAIRE

Le large spectre antifongique et la faible toxicité *in vivo* de l'iturine A permettent d'envisager son utilisation pour la protection des semis et des récoltes. En effet, cette molécule est considérée comme responsable de l'antagonisme *in vitro* de plusieurs souches de *Bacillus* vis-à-vis de champignons phytopathogènes comme *Penicillium digitatum*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* (Swinburne *et al.*, 1975) (Pusey et Wilson, 1984). Aucune étude *in vivo* n'était encore reporté pour ce type d'application au début du travail.

Par ailleurs, on énumère d'autres succès obtenus dans les laboratoires avec l'iturine A (Klich *et al.*, 1991). Cet antibiotique s'est montré efficace à de très faibles doses contre :

- *Penicillium italicum* et *Penicillium expansum* qui attaquent respectivement les citrons et les pommes pendant le stockage,

- *Aspergillus flavus*, responsable de la production d'aflatoxine cancérigène dans les denrées récoltées et *Fusarium moniliforme*, parasite des grains et toxique pour les poulets et les chevaux.

### 1.7.2. EN PHARMACEUTIQUE

Aucune propriété antivirale, antimycoplasme, cytotoxique, hypocholestérolémiant, immunomodulatrice et anti-inflammatoire n'est reportée pour les iturines, en particulier pour la mycosubtiline.

### 1.8. ETUDES TRANSCRIPTOMIQUES CHEZ *B. SUBTILIS*

Des études transcriptomiques complexes sont aujourd'hui possible avec *B. subtilis* grâce, d'une part, au séquençage complet du génome de la souche de Marburg, *B. subtilis* 168 (Kunst *et al.*, 1997) et, d'autre part, au développement de la technologie des biopuces à ADN (Schena *et al.*, 1995) (Lockhart *et al.*, 1996). La principale application des puces à ADN est l'étude du niveau d'expression des gènes et les mécanismes génétiques qui leur sont associés au niveau cellulaire. Les puces à ADN ont par exemple permis l'étude de phénomènes physiologiques d'importance comme la croissance en anaérobiose (Ye *et al.*, 2000), l'effet de la répression catabolique lors de la formation de biofilms (Stanley *et al.*, 2003) ou l'effet d'une carence en fer (Miethke *et al.*, 2006).

Des études transcriptomiques présentant un lien avec la problématique de la fourniture en précurseurs de la mycosubtiline ou avec la régulation de ces voies métaboliques ont été réalisées. Par exemple, une étude transcriptomique portée sur l'effet de l'ajout de casaminoacides dans le milieu de culture (Mader *et al.*, 2002) a révélé 120 gènes, principalement réprimés, impliqués dans les voies métaboliques de synthèse et de dégradation des acides aminés, dans les voies de la sporulation et de la compétence. Une étude plus ciblée de transcriptomique portant sur l'effet de la délétion du gène codant pour le régulateur de la transcription *CodY* a permis de révéler une liste de 100 gènes contrôlés directement ou indirectement par *CodY* (Molle *et al.*, 2003). Les auteurs montrent que le régulon *CodY* a notamment pour cible la plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés, ce qui sera confirmé dans des travaux ultérieurs (Mader *et al.*, 2004). Deux études en transcriptomique sont parus simultanément (Beckering *et al.*, 2002) (Kaan *et al.*, 2002)

### *1. Synthèse bibliographique*

portant sur l'effet d'un choc thermique par le froid. Ces études montrent l'importance des gènes *csp* codant pour les protéines de chocs froids et révèlent une trentaine de gènes impliqués dans les voies de synthèse des acides aminés et notamment des composés branchés.

## SITUATION ET OBJECTIF DU TRAVAIL

La souche naturelle *B. subtilis* ATCC 6633 synthétise plusieurs types d'antibiotiques. Certains d'entre-eux sont synthétisés par la voie non ribosomale, c'est le cas des rhizocitines, des surfactines et des mycosubtilines. Ces deux dernières familles d'antibiotiques ont une structure lipopeptidique qui se décline au travers d'une multitude d'homologues (longueur de la chaîne hydrocarbonée et type d'acide aminé constitutif) et d'isomères (*n-*, *iso* ou *anteiso*). Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, peu de résultats ont été obtenus concernant la biosynthèse de lipopeptides par la souche ATCC 6633, probablement en raison des faibles niveaux de production de lipopeptides obtenues jusque-là par les différents auteurs. Les objectifs du travail se déclinent en trois grandes parties.

L'étude dans un premier temps de l'activité biologique des mycosubtilines et de ses isoformes devra confirmer le large spectre d'action antifongique et mettre en évidence les différences d'activité des isoformes. La production de lipopeptides étant dépendante des conditions environnementales et aussi des souches utilisées, le but du travail sera ensuite d'étudier plus en avant les conditions de biosynthèse de mycosubtiline par la souche *B. subtilis* ATCC 6633. Pour cela, il s'agira de déterminer les conditions environnementales d'obtention, en quantité et en qualité, de l'isoforme de la mycosubtiline la plus active. Cette étape sera entreprise en étudiant les paramètres suivants : tests de différents milieux, optimisation de leur composition, effet des transferts de matière et du pH.

Il s'agira dans une deuxième étape de mettre en évidence une liste de gènes candidats impliqués dans différentes voies métaboliques liées à l'obtention sélective de l'isoforme de mycosubtiline la plus active. L'étude du transcriptome permettra à ce niveau de comparer les niveaux d'expression des 4200 gènes présents chez *B. subtilis*. Le rôle de quelques gènes choisis sera établi par des expériences complémentaires.

Pour finir, la mise en place d'un procédé de production de mycosubtiline en bioréacteur, tenant en compte les difficultés liées au caractère moussant du produit, visera à améliorer la productivité de la biosynthèse.

## CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. SOUCHES UTILISEES

Les souches et les plasmides utilisés dans ce travail sont répertoriés dans le tableau 8. *E. coli* JM109 a été utilisée pour le clonage et l'amplification des plasmides.

Tableau 8 : Souches et plasmides utilisés lors de cette étude

Souches		Génotype/Phénotype	Référence ou source
<i>B. subtilis</i>	<b>168</b>	Souche de laboratoire <i>trpC2</i>	Stock du laboratoire <sup>f</sup>
	<b>ATCC 6633</b>	Souche sauvage <i>Myc</i> <sup>a+b</sup> , <i>Srf</i> <sup>c+b</sup>	Stock du laboratoire <sup>f</sup>
	<b>BBG100</b>	ATCC 6633 <i>myc::P<sub>repU neo</sub></i> <sup>d</sup> <i>Myc</i> <sup>a+++b</sup> ; <i>Srf</i> <sup>c+b</sup> , <i>NmR</i> <sup>g</sup>	Leclère <i>et al.</i> , 2005
	<b>BBG111</b>	<i>trpC2</i> , <i>amyE::sfpcat</i> ; <i>CmR</i> <sup>h</sup>	Coutte <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i>	<b>JM109</b>	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , [F <sup>+</sup> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI</i> / <i>lacZ</i> $\Delta$ M15]	Promega
<b>Plasmides</b>			
	<b>pGEM-T Easy</b>	vecteur de clonage, <i>ApR</i> <sup>e</sup>	Promega
	<b>pBG114</b>	pGEM-T Easy <i>lacZ::sfp</i> ; <i>ApR</i> <sup>e</sup>	Ce travail
	<b>pBG115</b>	pGEM-T Easy <i>lacZ::sfp</i> orientation inverse; <i>ApR</i> <sup>e</sup>	Ce travail
	<b>pDG1661</b>	Vecteur d'intégration, <i>spoVG-lacZ</i> ; <i>ApR</i> <sup>e</sup> , <i>CmR</i> <sup>h</sup> , <i>SpcR</i> <sup>i</sup> ,	Stock du laboratoire <sup>f</sup>

<sup>a</sup> *Myc* : producteur de mycosubtiline. <sup>b</sup> + = faible production, +++ = forte production.

<sup>c</sup> *Srf* : producteur de surfactine. <sup>d</sup> *neo* : néomycine. <sup>e</sup> *ApR* : ampicilline résistant.

<sup>f</sup> Bacillus Genetic Stock Center. <sup>g</sup> *NmR* : néomycine résistant, <sup>h</sup> *CmR* : chloramphénicol résistant; <sup>i</sup> *SpcR* : spectinomycine résistant

Le tableau 9 présente la liste des amorces oligonucléotidiques utilisées dans l'étude.

Tableau 9 : Amorces oligonucléotidiques utilisées lors de cette étude

Fragments amplifiés	Nom de l'amorce	Tm	Séquence
<i>sfp</i>	<i>sfp</i> -forw	55°	5' CTGCTGAATTATGCTGTGG 3'
	<i>sfp</i> -rev	57°	5' TCGCTGAGGCTACATCAAG 3'
<i>ilvA</i>	<i>ilvA</i> -forw	41°	5' TTAGATTAGCAAATGG 3'
	<i>ilvA</i> -rev	45°	5' AGAAAACCTCTCTCATCC 3'
<i>cspB</i>	<i>cspB</i> -forw	42°	5' TTACGCTTCTTTAGTA 3'
	<i>cspB</i> -rev	33°	5' GAAGATTACTGGTAGAG 3'
<i>fenF</i>	<i>fenF</i> '-forw	60°	5' CAAAATGCAGATCCTGAGCA 3'
	<i>fenF</i> '-rev	60°	5' GGCATAGTCATGTGCGTTTG 3'
<i>rpl</i>	<i>rplL</i> '-forw	60°	5' GCTTCCGTTAAAGAAGCAACTG 3'
	<i>rplL</i> '-rev	60°	5' AGAAGCGCCAACCTTCTTCAA 3'
<i>cspB</i>	<i>cspB</i> '-forw	59°	5' AAAAGGTTTCGGATTCATCG 3'
	<i>cspB</i> '-rev	58°	5' AACGTTAGCAGCTTGTGGTC 3'

(') : amorces utilisées pour la PCR comparative

## 2.2 MILIEUX DE CULTURE

### 2.2.1. LE MILIEU DE LANDY

#### 2.2.1.1. COMPOSITION

La composition du milieu de Landy est la suivante : glucose, 20 g/L ; acide glutamique, 5 g/L ; extrait de levure, 1 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L ; MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g/L ; KCl, 0,5 g/L ; CuSO<sub>4</sub>, 1,6 mg/L ; Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 1,2 mg/L ; MnSO<sub>4</sub>, 0,4 mg/L

#### 2.2.1.2. SOLUTIONS STOCKS

Pour assurer une reproductibilité de la composition du milieu, des solutions concentrées stériles sont réalisées. La solution de glucose 10X (200 g/L) est stérilisée par autoclavage à 105°C durant 30 min. La solution d'acide glutamique 4X (20 g/L) est ajustée à

pH 8 par une solution de KOH 5 M et stérilisée par filtration sur filtre 0,2 $\mu$ m. La solution d'extrait de levure 20X (20 g/L) est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 15 min. La solution de minéraux n°1 40X (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 g/L ; MgSO<sub>4</sub>, 20 g/L, KCl, 20 g/L) est acidifiée par du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré jusqu'à dissolution totale des sels et est stérilisée par filtration sur filtre 0,2 $\mu$ m. La solution de minéraux n°2 40X (CuSO<sub>4</sub>, 64 mg/L ; Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 48 mg/L ; MnSO<sub>4</sub>, 16 mg/L) est acidifiée par du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré jusqu'à dissolution totale des sels et stérilisée par filtration sur filtre 0,2 $\mu$ m.

#### 2.2.1.3. RÉALISATION D'UN LITRE DE MILIEU DE LANDY

Le matériel utilisé, hormis les pipettes, qui sont stériles et à usage unique, est préalablement stérilisé par autoclavage à 121°C durant 20 minutes. 250 mL de la solution d'acide glutamique est prélevé stérilement et ensuite, versé dans la fiole d'Erlenmeyer. 100 mL de la solution de glucose y sont ajoutés stérilement, puis 50 mL de la solution d'extrait de levure et enfin 25 mL de chacune des solutions de minéraux. Le pH est ajusté à 7,0 à l'aide d'une solution de KOH 5M stérile. Le volume est amené à 1 L avec de l'eau stérile.

#### 2.2.1.4. RÉALISATION D'UN MILIEU DE LANDY TAMPONNÉ À 100 MM

Le tampon MOPS 20X (2M) est réalisé en dissolvant 20,93 g d'acide 3-[N-Morpholino]propanesulfonique (MOPS) dans 50 mL d'eau. La solution est stérilisée sur filtre 0,2  $\mu$ m sous une hotte à flux laminaire. Pour réaliser 1 L de milieu de Landy tamponné à 100 mM par du MOPS, 50 mL de MOPS 20 X sont ajoutés au mélange du § 2.2.1.3.

Le tampon MES 20X (2M) est réalisé en dissolvant 21,33 g d'acide 2-[N-Morpholino]éthanesulfonique (MES) dans 50 mL d'eau. La solution est stérilisée sur filtre 0,2  $\mu$ m sous une hotte à flux laminaire. Pour réaliser 1 L de milieu de Landy tamponné à 100 mM par du MES, 50 mL de MES 20 X sont rajoutés au mélange du § 2.2.1.3.

#### 2.2.1.5. MILIEU DE LANDY MODIFIÉ

L'acide glutamique est remplacé par du sulfate d'ammonium à 2,3 g/L. La composition du milieu de Landy modifié: Glucose, 20 g/L ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,3 g/L ; extrait de

levure, 1 g/L,  $K_2HPO_4$ , 1 g/L ;  $MgSO_4$ , 0,5 g/L ; KCl, 0,5 g/L ;  $CuSO_4$ , 1,6 mg/L ;  $Fe_2(SO_4)_3$ , 1,2 mg/L ;  $MnSO_4$ , 0,4 mg/L.

La solution stock de sulfate d'ammonium 10X (23 g/L de  $(NH_4)_2SO_4$ ) est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 15 min. Pour réaliser 1 L de milieu de Landy modifié, 100 mL de solution stock de sulfate d'ammonium 10X sont ajoutés au mélange du § 2.2.1.3 ne contenant pas d'acide glutamique.

### **2.2.2. LE MILIEU ACS**

La réalisation d'un litre de milieu ACS nécessite la préparation préalable de deux solutions qui seront autoclavées séparément. Ces solutions seront mélangées sous hotte à flux laminaire pour l'obtention du milieu fini. La solution 1 : 100 g de glucose sont ajoutés dans un volume de 400 mL d'eau et stérilisé à 105°C durant 30 minutes. La composition de la solution 2 est la suivante: acide citrique, 11,7 g ; extrait de levure, 5 g ;  $(NH_4)_2SO_4$ , 4 g ;  $Na_2SO_4$ , 4,2 g ; KCl, 0,72 g ;  $MgCl_2 \times 6H_2O$ , 0,42 g ;  $ZnCl_2$ , 10,4 mg ;  $FeCl_3 \times 6H_2O$ , 24,5 mg ;  $MnCl_2 \times 4H_2O$ , 18,1 mg. Le pH est ajusté à 6,9 avec une solution de KOH 5M. Le volume est ensuite amené à 600 mL avec de l'eau distillée et stérilisée à 121°C durant 20 min.

### **2.2.3. MILIEU DSM**

La réalisation d'un litre de milieu DSM nécessite la préparation préalable de deux solutions qui seront autoclavées séparément. Ensuite, ces solutions seront mélangées sous hotte à flux laminaire pour l'obtention du milieu fini. La composition de la solution 1 est la suivante : bouillon nutritif, 8 g ;  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0,108 g ; KCl, 1,8 g. Le pH est ajusté à 7,0 avec une solution de KOH 5M. Le volume de la solution est amené à 500 mL avec de l'eau distillée et stérilisé par autoclavage à 121°C durant 15 min. La composition de la solution 2 est la suivante:  $Ca(NO_3)_2 \times 4H_2O$ , 236,15 mg ;  $MnCl_2 \times 4H_2O$ , 0,198 mg ;  $FeSO_4 \times 7H_2O$ , 0,0278 mg. Le volume de la solution 2 est amené à 500 mL avec de l'eau distillée et stérilisé par autoclavage à 121°C durant 15 min.

### 2.2.4. MILIEU E MODIFIE

Le milieu E de Clark est modifié en diminuant la concentration en glucose de 40 à 20 g/L. La composition du milieu est la suivante : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 g/L ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18,9 g/L; Extrait de levure, 0,5 g/L; Glucose, 20 g/L; EDTA, 0,05 g/L; MgSO<sub>4</sub>, 0,61 g/L; MnSO<sub>4</sub>, 0,056 g/L; NaCl, 0,1 g/L; CaCl<sub>2</sub>, 0,012 g/L; ZnSO<sub>4</sub>, 0,018 g/L; FeSO<sub>4</sub>, 0,018 g/L; CuSO<sub>4</sub>, 0,002 g/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,001 g/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,001 g/L; Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0,001 g/L; NiCl<sub>2</sub>, 0,0037 g/L; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 4 g/L; MgSO<sub>4</sub>, 1 g/L. Le pH de la solution est ajusté à 6,5 par une solution d'HCl à 10%.

### 2.2.5. MILIEU LURIA-BERTANI (LB)

La composition du milieu LB est la suivante: Tryptone, 10 g/L; Extrait de levure, 5 g/L; NaCl, 10 g/L ; pH 7,2.

### 2.2.6. MILIEU MS1

La composition du milieu MS1 est la suivante : glucose, 5g/L ; hydrolysate de caséine, 0,2 g/L ; extrait de levure, 1 g/L ; MgSO<sub>4</sub>, 0,2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,98 g/L ; citrate de sodium trisodique (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>), 0,87 g/L ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18,24 g/L ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,96 g/L. Le tryptophane concentré à 0,05 g/L est ajouté au milieu MS1 dans le cas de la mise en culture de la souche *B. subtilis* 168.

### 2.2.7. GÉLOSES

La composition des géloses est détaillée dans le tableau 10.

Tableau 10: Composition des géloses utilisées dans l'étude

<b>Gélose de Mossel</b>	Extrait de viande, 1 g/L; Peptone, 10 g/L; D-mannitol, 10 g/L; NaCl, 10 g/L; Rouge de phénol, 0,025 g/L; Agar, 12 g/L; Jaune d'œuf, 10 mL/L; Polymyxine, 5 mL/L; pH 7,1
<b>Gélose nutritive (GN)</b>	Extrait de levure 10 g/L; Peptones 10 g/L; Glucose 10 g/L; Agar 18 g/L

## **2.3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

### **2.3.1. EXTRACTIONS D'ADN ET PCR**

Les extractions d'ADN à partir de gels d'agarose sont réalisées avec le kit QIAquick extraction (Qiagen). Le protocole utilisé pour l'amplification est standard, seule la température d'hybridation varie selon le  $T_m$  calculé à partir du logiciel Primer 3 lors de la détermination des amorces. L'appareil de PCR utilisé est le « Eppendorf Mastercycler Personal » (Eppendorf AG).

L'amplification est réalisée en procédant au mélange suivant : 7,5  $\mu$ L d'ADNg à environ 100 ng/mL, 5  $\mu$ L de tampon Taq (Fermentas), 0,5  $\mu$ L de dNTPs, 2,5 $\mu$ L de l'amorce anti-sens, 2,5  $\mu$ L de l'amorce sens (Eurogentec), 0,4  $\mu$ L de Taq polymérase (5 U/ $\mu$ L) (Fermentas), qsp 50  $\mu$ L avec H<sub>2</sub>O. Le programme PCR utilisé est : 2 min à 90°C, 30 s à 90°C, 30 s à la température d'hybridation, 2 min à 70°C pendant 30 cycles puis 5 min à 70°. La séquence se termine par une conservation à 4°C.

### **2.3.2. EXTRACTION DE PLASMIDES PAR LA METHODE « BOILING »**

Cinq mL de culture d'une nuit sur milieu LB à 37°C sont centrifugés pendant 15 min à 7000 g. Le culot est ensuite repris dans 350  $\mu$ L de tampon « boiling » dont la composition est la suivante : saccharose, 8% ; Triton X-100, 0,5% ; EDTA, 50 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8. Puis 25  $\mu$ L de solution de lysozyme à 10 mg/mL sont ajoutés. L'ensemble est placé dans de l'eau bouillante pendant 50 s. Le tube est ensuite centrifugé 20 min à 13000 g. Le culot est alors éliminé. Puis 44  $\mu$ L de d'acétate de sodium 2 M et 440  $\mu$ L d'isopropanol sont ajoutés au surnageant. Le tout est centrifugé 20 min à 13000 g. Le culot est lavé par 500  $\mu$ L d'éthanol 70%. Après séchage à l'air, le culot est resuspendu dans du tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> dont la composition est la suivante : Tris-HCl, 10 mM ; EDTA, 1 mM ; pH 8.

### **2.3.3. ENZYMES ET KITS DE PURIFICATION**

Les enzymes de restriction utilisées, le fragment Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli*, et la T4 DNA-ligase proviennent de MBI Fermentas. Si nécessaire, les plasmides ont été purifiés par les kits « QIAfilter Plasmid Maxi Kit (10) » et QIAprep Spin Miniprep Kit (50) » (Qiagen). Les fragments purifiés sur gel d'agarose (0,8% ; Euromedex) ont été extraits

par « QIAquick Gel Extraction Kit (50) » (Qiagen). Après les réactions enzymatiques, l'ADN plasmidique a été purifié, si nécessaire, par « MinElute Reaction Cleanup Kit (50) » (Qiagen).

#### **2.3.4. CLONAGE DANS LE PLASMIDE pGEM-T EASY**

Les PCR ont été réalisées avec la Taq ADN polymérase « Arrow » de Qiagen. Les fragments amplifiés ont ensuite été clonés dans le plasmide pGEM-T Easy (Promega), plasmide linéaire possédant une désoxythymidine débordant à chaque extrémité et permettant le clonage de produit de PCR (Tang *et al.*, 2000). Ce plasmide n'est répliquatif que chez *E. coli*, il possède une cassette de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un site multiple de clonage au niveau du gène *lacZ*. Afin d'optimiser le clonage, les produits de PCR obtenus ont été préalablement adénylés en 5' par un traitement à la Taq polymérase (5 unités par  $\mu\text{L}$ ) pendant 30 min à 72°C. Après ligature et transformation par choc thermique de la souche *E. coli* JM109 (souche et protocole fournis par Promega), la sélection des clones possédant le plasmide recombiné a été réalisée sur milieu LB complété avec de l'ampicilline (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), du X-Gal (8 mg/L) et de l'IPTG (80  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Seuls sont sélectionnés les clones blancs. Afin de connaître l'orientation des fragments au sein du plasmide pGEM-T Easy, des extractions de plasmides par la méthode « boiling » ont été réalisées et des tests par restriction ont été effectués. Les plasmides qui en résultent ont été extraits et purifiés avec le kit Plasmid MiniPrep (Qiagen).

Les contrôles par électrophorèse d'ADN ont été réalisés sur gel d'agarose 0,7% dans le tampon TBE 0,5 X (Tris-HCl, 44,5 mM ; acide borique, 44,5 mM ; EDTA, 1 mM ; pH 8,3) contenant du bromure d'éthidium (0,5  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Les résultats sont lus à l'aide de l'appareil GelDoc de Bio-Rad. L'analyse se fait à l'aide du logiciel Quantity One (version 4.1.1) et les photos sont exportées au format TIFF.

#### **2.3.5. TRANSFORMATION DANS *B. SUBTILIS***

La transformation de *B. subtilis* a été réalisée par compétence naturelle. Celle-ci peut être obtenue à partir d'un isolement frais et une culture réalisée dans du milieu MS1 pendant 5 h à 37°C. L'ensemencement est réalisé à une  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,7 dans un volume de 5 mL. Puis un ensemencement avec une dilution au  $10^{\text{ème}}$  est réalisé dans du milieu MS2, c'est-à-dire du

milieu MS1 auquel est rajouté du  $MgCl_2$  (2,5 mM) et  $CaCl_2$  (250 nM). L'ensemble est mis à incuber à 37°C pendant 1 h 30 sous agitation.

Les cellules sont alors prêtes pour la transformation, l'ADN à intégrer est mis en contact avec 100  $\mu$ L de cellules et incubé pendant 30 min sous agitation à 37°C.

Trois stratégies de clonage par recombinaison homologue ont été testées dans le cadre de ce travail. Les cellules rendues compétentes ont été transformées soit à partir du plasmide pGEM-T Easy portant le fragment ; soit directement à partir du fragment sous forme linéaire (récupéré après digestion du pGEM-T Easy avec l'enzyme *EcoRI*) ; soit après insertion du fragment dans le locus *amyE* du plasmide (Lee *et al.*, 2005). Le but était d'avoir une recombinaison homologue au niveau du gène d'intérêt de la souche *B. subtilis* 168.

## **2.4. EXTRACTION DES ARN TOTAUX CHEZ *B. SUBTILIS***

Deux protocoles d'extraction d'ARN ont été testés dans le cadre de ce travail. Le premier est basé sur la solution RNeasy (Qiagen), le second sur la solution Ribo-Pure Bacteria (Ambion). Des difficultés ont été rencontrées car le rendement théorique d'extraction annoncé par les fabricants n'a jamais pu être obtenu. L'amélioration des protocoles de référence décrits ci-dessous est présentée dans le § 4.2.2.

### **2.4.1. KIT QIAGEN RNEASY®**

#### **2.4.1.1. BLOCAGE**

Afin de figer immédiatement le transcriptome de *B. subtilis* au moment du prélèvement sur la culture, un volume correspondant à  $5 \cdot 10^9$  cellules est traité par une solution saline de RNA « protect bacteria » (Qiagen) (v/v) dans un tube Eppendorf ou Falcon traité contre les RNAses. Après passage au vortex 10 s puis centrifugation 10 min à 5000 g et 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est repris par 0,5 mL de solution RNA « protect bacteria ». Les culots sont conservés à -80°C.

#### 2.4.1.2. EXTRACTION

Les ARN totaux sont ensuite extraits à partir des culots obtenus au § 2.4.1.1. La méthode ici employée est une méthode alliant à la fois une lyse enzymatique par du lysozyme et une lyse mécanique par des billes de verre. Un volume de billes de verre est nécessaire pour un volume de lysat. Le protocole d'extraction suivant est déterminé pour  $5.10^9$  cellules.

Les culots bactériens sont resuspendus dans 2 mL de tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> contenant du lysozyme à 10 mg/mL. L'ensemble est mis à incuber 30 min à température ambiante en homogénéisant au vortex toutes les 10 min. Puis, 4 mL de tampon RLT (tampon fourni par Qiagen) contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol sont ajoutés au mélange, le tout est agité au vortex pendant 2 min en continu. Le lysat obtenu est transféré dans un tube stérile contenant les billes de verre ( $\varnothing 106 \mu\text{m}$ ; traitées à l'acide, passées sous U.V. et autoclavées). Le tout est agité au vortex en continu pendant 4 min. Le lysat est alors centrifugé pendant 5 min à 5000 g.

Enfin, les ARN totaux sont purifiés avec le RNeasy Midi kit complété d'un traitement à la DNase. L'élution se fait dans 200  $\mu\text{L}$  d'eau pure exempte de RNase. Les ARN totaux sont conservés à  $-20^\circ\text{C}$  dans de l'éthanol 95% à raison de 2,5 volumes d'éthanol pour un volume d'éluat.

#### **2.4.2. KIT AMBION RIBO-PURE BACTERIA<sup>®</sup>**

##### 2.4.2.1. BLOCAGE

Dans le but de bloquer le transcriptome, un volume de culture correspondant à  $5.10^8$  cellules est traité par une solution saline de RNALater (Ambion) (v/v) dans un tube Eppendorf ou Falcon traité contre les RNases. Après passage au vortex 10 s puis centrifugation 10 min à 11 000 g et  $-9^\circ\text{C}$ , le surnageant est éliminé et le culot est repris par 0,5 mL de solution RNALater. Les culots sont placés 24 h à  $4^\circ\text{C}$  puis sont conservés à  $-80^\circ\text{C}$ .

##### 2.4.2.2. EXTRACTION

L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir des culots bactériens obtenus au § 2.4.2.1. Les cellules, conservées dans 0,5 mL de RNALater sont centrifugées 1 min à 12000 g

puis remises en suspension dans 350  $\mu$ L d'une solution de solution RNAWiz qui est une solution contenant du phénol (Ambion). Ceci permet la fragilisation des cellules et la dissolution des composants cellulaires associé à l'inhibition des RNAses et à la stabilisation des ARN.

Ensuite, les cellules sont transférées dans un tube contenant 250  $\mu$ L de billes de zirconium puis lysées par passage au Mixer1000 10 min. Le lysat est centrifugé 5 min à 12000 g à 4°C puis les billes de zirconium sont éliminées. Le chloroforme (0,2 vol) est ajouté au lysat cellulaire et le mélange est incubé 10 min à température ambiante. Après centrifugation 5 min à 12000 g à 4°C, la phase aqueuse est récupérée et l'éthanol 100 % est ajouté (0,5 vol).

L'ARN est purifié par passage de la solution à travers une colonne puis par lavage avec 700  $\mu$ L de solution de lavage 1 et 2\*250  $\mu$ L de solution de lavage 2 et 3. Les ARNs sont élués par 50  $\mu$ L de la solution d'éluat préchauffée.

Enfin, un traitement à la DNase I est réalisé et l'éluat est incubé 30 min à 37°C. Le réactif d'inactivation de la DNase est alors rajouté à raison de 20% du volume. L'échantillon est mis à incuber 2 min à température ambiante, centrifugé 1 min à 12000 g et finalement transféré dans un tube exempt de RNAses. Les ARN totaux sont conservés à -20°C dans de l'éthanol 95% à raison de 2,5 volume d'éthanol pour un volume d'éluat.

### **2.4.3. CONTROLE DES ARN EXTRAITS**

A la fin de chaque extraction d'ARN, un contrôle de la quantité et de la qualité des ARN extraits est effectué.

#### **2.4.3.1. DETERMINATION DE LA QUANTITE DES ARN EXTRAITS**

Après extraction des ARN totaux, la concentration de matériel extrait est estimée par une mesure d'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop) mesurant des absorbances sur un volume d'échantillon de 1  $\mu$ L. L'évaluation de la contamination de l'échantillon par des protéines est effectuée par mesure du rapport d'absorbance 260/280 nm. L'évaluation de la contamination de l'échantillon par des solvants

organiques, des sels et des protéines est effectuée par mesure du rapport d'absorbance 260/230 nm.

#### 2.4.3.2. DETERMINATION DE LA QUALITE DES ARN EXTRAITS

Cette vérification est réalisée à l'aide du kit NA 6000 NanoAssay (Agilent) utilisé avec l'électrophorèse capillaire Bioanalyzer 2100 (Agilent). L'évaluation de l'intégrité des ARN est réalisée par mesure du rapport de concentration des ARN ribosomiaux 23S/16S et par vérification de la quasi-continuité de la ligne de base.

### **2.5. PUCES A ADN**

#### **2.5.1. PRINCIPE TECHNOLOGIE DES PUCES A ADN**

Sur une puce à ADN, des dizaines de milliers d'hybridations peuvent être réalisées simultanément. Les hybridations se font entre des sondes nucléotidiques (*probe* ou *reporters*) ordonnées sur un support solide et des cibles (Molle *et al.*, 2003) marquées (figure 10), présentes dans un mélange complexe. Les sondes et les cibles représentent respectivement les gènes du transcriptome à analyser. Le signal d'intensité, recueilli pour chaque hybridation spécifique « sonde-cible », permet d'apprécier le niveau d'expression de chaque gène étudié dans le tissu analysé. Un profil d'expression est obtenu pour chaque échantillon.

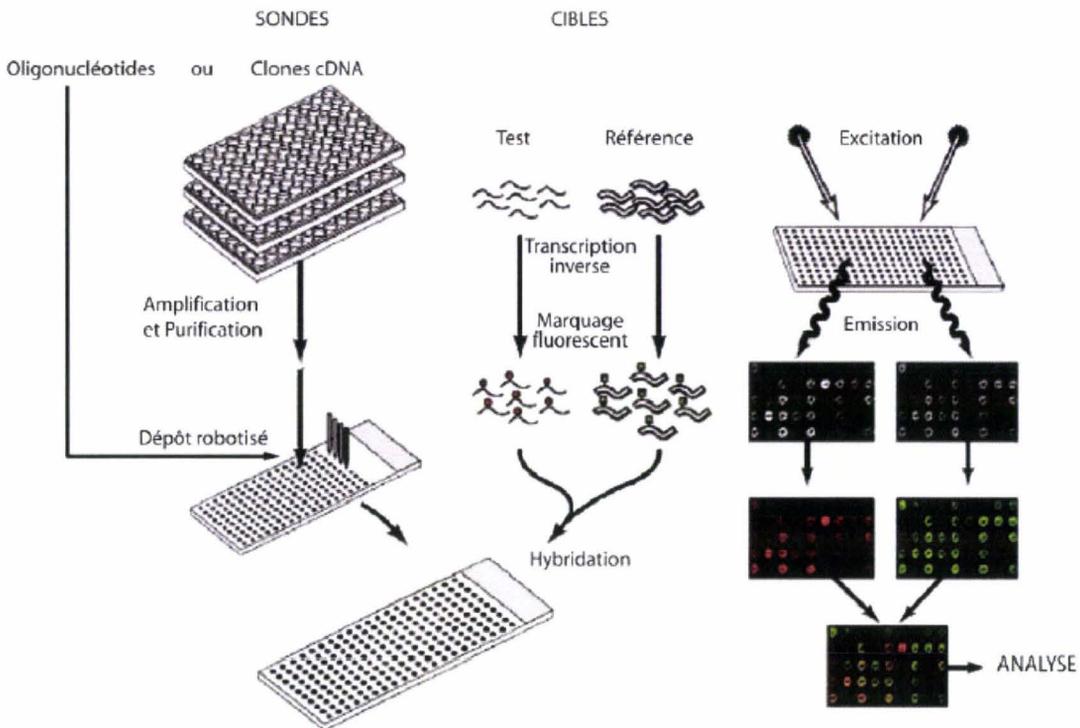


Figure 10. Schématisation de la technique d'analyse du transcriptome par la technologie des puces à ADN

Les sondes (oligonucléotides ou clones d'ADNc purifiés et amplifiés) sont déposées mécaniquement sur une lame de verre. Parallèlement, les cibles sont couplées à des marqueurs fluorescents (parfois amplifiés) par transcription inverse. Par exemple, la cible test est marquée par une Cyanine 5 (Cy5) rouge et la cible de référence par une Cyanine 3 (Cy3) verte. Les cibles sont assemblées pour former un mélange complexe. Ce mélange pourra s'hybrider, dans des conditions de stringence particulières, avec les sondes présentes sur la puce. La lecture est réalisée par un scanner muni d'un microscope confocal, couplé à deux lasers. Ces lasers possèdent des longueurs d'ondes d'excitation spécifiques, correspondant à celles des deux marqueurs fluorescents. L'excitation et l'émission (amplifiée par des photomultiplicateurs) des fluorochromes permettent l'obtention de deux images (une pour chaque marqueur) en niveau de gris. Ces images sont ensuite converties en pseudo-couleur et fusionnées pour être analysées par un logiciel d'analyse d'images.

Les puces à ADN ont d'abord été conçues sur de grandes membranes poreuses en nylon ou *macroarrays*. La miniaturisation, rendue possible par les progrès de la robotique, a ensuite permis le développement des *microarrays*. Comme leur nom l'indique, ces puces à ADN sont de plus petites surfaces telles une lame de microscope (Schena *et al.*, 1995) ou une petite membrane nylon (Bertucci *et al.*, 1999). Elles présentent également l'avantage de pouvoir être de très haute densité et par conséquent sont susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme. La particularité des puces à ADN, par rapport aux *macroarrays*, réside dans la miniaturisation du procédé permettant l'utilisation d'une moindre quantité de matériel génétique pour une densité plus importante de sondes. Les supports sur lesquels sont fixées les sondes sont des supports solides, de surface plane généralement inférieure à 1 cm<sup>2</sup>. Les matériaux qui les composent peuvent être du verre, des polymères, du silicium, de l'or ou encore du platine. Quel que soit le support choisi, il est traité pour former un réseau dense et régulier de micro-surfaces où seront greffées les sondes.

Les sondes sont qualifiées de « *gene reporter* » car elles représentent des fragments de gènes et rapportent leur niveau d'expression. Ces *gene reporters*, ordonnés sur les lames, peuvent être des produits de PCR (puce à ADNc) (Schena *et al.*, 1995) ou des oligonucléotides plus ou moins longs (25 à 70 mers). Les produits de PCR et les oligonucléotides issus de synthèses chimiques (50-70 mers) sont greffés sur les puces à ADN par adressage mécanique ou électrochimique. Les oligonucléotides peuvent également être synthétisés *in situ*. Breveté par la société Affymetrix®, la synthèse *in situ* par photolithographie, ou adressage photochimique, rappelle une technique couramment utilisée pour la fabrication des puces électroniques (Lockhart *et al.*, 1996).

Les cibles sont les échantillons à étudier. Elles peuvent avoir différentes origines (tissu, une culture...) et de différentes natures (ARNm, ADNc...). Selon la technologie de puce utilisée, les cibles sont identifiées par un marquage radioactif ou fluorescent. Bien que moins sensibles que les marquages radioactifs, certains systèmes de marquages fluorescents présentent l'avantage de pouvoir identifier plusieurs cibles sur la même puce. Par exemple, un tissu « anormal » peut être marqué par une cyanine verte (Cy3) et un tissu « sain » peut être identifié par une cyanine rouge (Cy5). Le rapport (*ratio*) des intensités obtenues pour chaque fluorochrome offre une comparaison directe des variations d'expression entre les deux

échantillons. La lecture des résultats d'hybridation se fait grâce à un scanner. Dans le cas des technologies à fluorescence, son principe est celui d'un microscope confocal couplé à un ou plusieurs lasers. Chaque laser excite spécifiquement un fluorochrome. L'émission est amplifiée par un photomultiplicateur et transformée en signal digital, *i.e.* en image. Chaque pixel de l'image scannée représente une mesure de fluorescence. Pour les puces à ADN deux couleurs, deux images en niveau de gris sont générées (une pour chaque fluorochrome). Ces images sont converties en fausses couleurs (allant généralement du vert au rouge) et superposées. Un logiciel d'analyse d'images extrait des informations qualitatives (diamètre, niveau de saturation) et semi quantitatives (intensité du signal et du bruit de fond) pour chaque complexe sonde-cible (*spot*) dans chacun des fluorochromes. Des méthodes et outils informatiques sont ensuite nécessaires pour analyser et extraire la connaissance des données.

### **2.5.2. TRANSCRIPTION INVERSE ET MARQUAGE FLUORESCENT DES TRANSCRITS**

Les ARN totaux sont dans un premier temps précipités à l'aide d'une solution d'acétate de sodium 3M pendant 1 h à -20°C. Puis après une centrifugation à 4°C à 14000 g pendant 20 min, le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 70%. L'ensemble est de nouveau centrifugé selon les mêmes conditions citées ci-dessus. L'éthanol est alors éliminé et le culot est repris dans 20 µL d'eau pure exempte de RNase. Puis, 1 µL de l'éluat est récupéré afin de déterminer les concentrations en ARN totaux des échantillons à l'aide du spectrophotomètre ND-1000.

Dix µg d'ARNs totaux sont rétrotranscrits et le marquage se fait à l'aide d'oligonucléotides dUTP marqués avec une cyanine, alternativement Cy3 ou Cy5. Le mélange réalisé pour la transcription inverse a un volume final de 40 µL et a la composition suivante : tampon Pol 5X (Life Technologies); 0,1 pmole d'amorces spécifiques de *B. subtilis* 168 (Primer mix, Eurogentec); 3,3 mM de chacun des oligonucléotides dATP, dGTP et dCTP ; de dUTP Cy3 ou Cy5 (1mM) et de dTTP (1mM) ; de 0,1 M de dithiothréitol (DTT) ; 1 µL de RNasin (Promega) et d'eau milli-Q exempte de RNase. Le tout est incubé à 65°C pendant 5 min, puis à 42°C pendant 5 min. 200 unités de polymérase superscript II (Life Technologies) sont ajoutées au mélange. L'ensemble est ensuite incubé à 42°C pendant une heure, puis 200 unités de polymérase superscript II sont à nouveau ajoutées. On renouvelle l'incubation pendant 1 h. La transcription inverse est arrêtée par ajout de 20 µL

d'une solution de NaOH 0,1 M contenant 2 mM d'EDTA, l'ensemble est mis à incuber à 65°C pendant 30 min. Le tout est neutralisé par 20 µL d'HCl 0,1 M.

Les échantillons sont alors purifiés sur colonne à l'aide du kit «Qia-quick PCR purification» (Qiagen). Enfin, de nouvelles mesures à 260 nm, 550 nm et 650 nm sont réalisées avec le NanoDrop ND-1000. Ce, dans le but de déterminer la quantité d'ADN complémentaire formé, la fréquence d'incorporation et la quantité de cyanine incorporée selon les relations suivantes :

- Quantité d'ADN complémentaire rétrotranscrit :  
 $A_{260} \times 37 \times \text{volume total de l'échantillon } (\mu\text{L}) = \text{en ng}$
- Quantité de fluorochrome incorporé :  
Cy3 :  $A_{550} \times (\text{volume total de l'échantillon})/0,15 = \text{en pmol de fluorochrome Cy3 incorporé}$   
Cy5 :  $A_{650} \times (\text{volume total de l'échantillon})/0,25 = \text{en pmol de fluorochrome Cy5 incorporé}$
- Fréquence d'incorporation,  $f_i$  (nombre de nucléotides (nt) marqués pour 1000 nt) :  
 $f_i = \text{pmol de fluorochrome incorporé} \times 324,5 / \text{quantité d'ADN}_c \text{ (ng)}$ .

### **2.5.3. HYBRIDATION SUR BIOPUCES ET LAVAGE**

L'hybridation et la gestion des tampons est entièrement automatisée grâce à l'appareil Discovery (Ventana). Le protocole démarre par un prétraitement des puces à ADN qui se présentent sous la forme de lames de verre (EGT168, Eurogentec). Ce prétraitement fait appel à trois solutions de compositions inconnues fournies par Ventana. Le prétraitement permettant de réduire l'hydrophobicité de la lame dure au total 45 min. Il permet une meilleure répartition de l'ADN<sub>c</sub> marqué (cible).

L'hybridation commence en déposant sur la lame 20 µL de la cible mélangée à 200 µL d'une solution d'hybridation. L'hybridation dure au total 8 h. Une fois l'hybridation terminée, 2 lavages de stringence (2 x 4 min) et un nettoyage de la puce sont réalisés. Le Discovery inclut un lavage des lames, mais les précédentes expériences de la plateforme de génomique fonctionnelle ont démontré la nécessité d'effectuer un lavage supplémentaire afin d'y éliminer toutes traces d'huile. Les lames sont lavées par quatre solutions successives fournies par

Ventana : du tampon 2X SSC, du tampon de 1X SSC, de l'eau et de l'éthanol. Les lames sont ensuite séchées par centrifugation pendant 10 min à 1000g.

Les puces à ADN peuvent ensuite être scannées à partir du scanner Genepix Personal 4100A qui va collecter les intensités émises par les cyanines Cy3 et Cy5 dont la longueur d'onde de lecture se situe respectivement à 532 nm et 635 nm. L'apposition de la grille de correspondance entre les spots et l'identifiant des spots puis l'acquisition des données et enfin l'analyse des spots est effectué à l'aide du logiciel Genepix Pro 6.

#### **2.5.4. ANALYSE DES DONNEES DES PUCES A ADN**

##### **2.5.4.1. LOGICIEL MIDAS**

Les fichiers bruts émanant du logiciel GenePix sont convertis du format .gpr au format .mev. Ce dernier format est reconnu par le logiciel Midas (TM4) dédié au traitement des données de biopuces. La séquence d'opérations unitaires du traitement des données est la suivante :

- exclusion des spots dont l'intensité, F est proche de celle du bruit de fond local, B.
- exclusion des spots portant la mention « Flag », c'est-à-dire ceux qui ne présentent pas une circularité ou une homogénéité suffisante,
- mise à l'échelle des données,
- lissage des données par LOWESS (Local WEighted Smoothing Scatterplot),
- vérification de la consistance des données (seulement dans le cas d'un marquage croisé, appelé flip-dye),
- analyse des niveaux d'expression des gènes en excluant les spots dont la valeur est comprise entre  $\pm 2\sigma$  de la valeur moyenne de la distribution des valeurs des spots (slice analysis).

#### 2.5.4.2. TABLEUR

Le fichier des données Midas listant les spots d'intérêt est ensuite finalisé sous le tableur Excel. La séquence de traitement comprend :

- la mise en correspondance de l'identité du spot avec le nom et la fonction, avérée ou présumée, du gène correspondant,
- l'exclusion des spots non présents sous la forme de duplicats,
- l'exclusion des spots dont la valeur moyenne du logarithme du ratio d'expression est comprise entre +/-0,5.

Une liste de gènes d'intérêt est obtenue au terme de cette séquence de traitement. La valeur du rapport d'expression de chaque gène et le nom du gène correspondant sont finalement représentés sur un graphique de synthèse.

Il est à noter que la méthodologie proposée dans le cadre de ce travail a été validée au travers d'une étude comparative. En effet, la liste des gènes d'intérêts obtenue ici a été comparée avec celle obtenue avec une méthodologie statistique non paramétrique de type Bootstrap combinée à une analyse de la variance de type ANOVA. Les outils de programmation ayant permis cette analyse ont été compilés sous le logiciel R par Arnaud Schloesing dans le cadre d'une collaboration avec la plateforme de génomique fonctionnelle de l'Université de Lille II. L'étude comparative a démontré que l'intégralité des gènes contenus dans la liste générée par le traitement combiné Midas / Excel se retrouvaient dans l'autre liste.

#### 2.5.4.3. LOGICIEL KEGARRAY

Le logiciel KegArray, version 0.5.5.beta, constitue une interface dynamique entre les données issues des puces à ADN et les bases de données des voies métaboliques de *B. subtilis* disponibles sur le serveur KEGG Pathway. La fonction « View colored pathway maps » fournit une liste des voies métaboliques où les enzymes correspondants aux gènes sous-exprimés ou sur-exprimés sont annotées en rouge ou en vert. Le format du fichier de transfert sous KegArray est le suivant :

```

#
# KEGG/EXPRESSION
# filename : ex0001764.dat
# created : 2007/07/19
17:02:18
# organism : bsu
#
#ORF          x          y          Control-   Control-   Target-   Target-
              x          y          sig        bkg        sig        bkg
BG10100      3          3          1  146955    20160    260066    29760
BG10671      6          6          1  138133    20040    365858    22440
BG10735      25         25         1  585723    20160    1044720   28680
BG11059      27         27         1  113021    19800    69641     23040

```

Ce fichier doit être enregistré sous le format txt avec délimitation de la tabulation. Sa constitution nécessite d'établir la correspondance entre chaque gène et son identité au format KEGG.

### 2.5.5. PCR COMPARATIVE

L'étape de transcription inverse de la PCR comparative est réalisée en mélangeant dans la glace : 3 µg d'ARN total dans 7,7 µL H<sub>2</sub>O avec 0,5 µL de solution d'hexamères (Invitrogen). L'ensemble est chauffé à 65°C pendant 10 mn au bain-marie, puis refroidi dans de la glace. Le mélange suivant est ajouté à l'ARN : 3 µL de tampon 5X First Strand (Invitrogen), 1,5 µL DTT à 0.1M (Invitrogen), 0,3 µL du mélange (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) à 25 mM (Amersham), 1µL de Rnase Inhibitor (Promega), 1 µL de SuperScript II (200 U/µL, Invitrogen). Le mélange est mis à incuber à 42°C pendant 1 h. La réaction est relancée en ajoutant 0,5 µL de SuperScript II au mélange mis à incuber 45 min supplémentaires à 42°C.

La PCR est réalisée en procédant au mélange suivant : 0,5 µL de D'ADNc, 2,5µL de tampon 10X, 1µL de dNTP 2.5mM, 1.5µL MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,5µL de l'amorce anti-sens, 0,5µL de l'amorce sens, qsp 25µL avec H<sub>2</sub>O, 0,2 µL de Taq Gold (5 U/µL). Le programme PCR utilisé est le suivant : 5 min à 94°C, 30 s à 94°C, 30 s à 56°C, 1 min à 72°C pendant 30 cycles puis 5 min à 72°C terminé par 5 min à 4°C.

## 2.6. CULTURES EN FIOLES D'ERLENMEYER DE *B. SUBTILIS*

### 2.6.1. PREPARATION D'UN SOUCHIER

Un tube à vis contenant 5 mL de milieu E modifié est inoculé par une colonie du souchier primaire et mis à incuber à 30°C pendant 48 h sous une agitation de 300 rpm. Le tube est ensuite homogénéisé au vortex. Un volume de 1,5 mL de la culture obtenue précédemment est ajouté à 48,5 mL de milieu E modifié contenus dans une fiole d'erlenmeyer de 500 mL. Le tout est mis à incubation à 30°C pendant 12 à 24 h sous une agitation de 120 rpm (cette première préculture P1 est doublée). La culture est homogénéisée au vortex, la  $DO_{600nm}$  est alors mesurée comme indiquée précédemment. La souche doit être en début/milieu de phase exponentielle de croissance. La seconde préculture P2 est inoculée par 1,5 mL de la culture de la meilleure fiole de P1 et est doublée. Les fioles d'erlenmeyer de 500 mL contiennent, comme volume final, 50 mL de milieu E modifié et sont incubées à 30°C sous une agitation de 120 rpm. La croissance est arrêtée lorsque la  $DO_{600nm}$  indique que la culture est en début/milieu de phase exponentielle de croissance. La pureté et la qualité de P2 sont contrôlées, par une observation au microscope et par ensemencement d'une gélose nutritive et d'une gélose de Mossel, plus spécifique des bacilles, complémentée en antibiotiques à 50 µg/mL dans le cas de microorganismes génétiquement modifiés et mises à incubation à 30°C pendant 24 h. Il est à noter que *B. subtilis* produit des colonies de formes irrégulières, les contours sont ondulés et peuvent présenter des filaments, de consistance crémeuse et dont le diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Dans les vieilles cultures, les colonies prennent un aspect sec, rugueux et elles s'incrustent dans la gélose. Pour finir, une fiole de 2 L contenant 200 mL de milieu E modifié est inoculée à 5% avec la meilleure fiole de P2. Cette fiole est incubée à 30°C sous une agitation de 120 rpm et la croissance est arrêtée lorsque la  $DO_{600nm}$  indique que la culture est en début/milieu de phase exponentielle de croissance. La qualité et la pureté de la culture sont contrôlées comme indiqué pour P2. La culture est centrifugée à 2000g pendant 10 min à 25°C. Les culots sont lavés à l'eau physiologique stérile puis les suspensions sont centrifugées à 2000g pendant 10 min à 25°C. Les culots sont repris dans un volume de milieu E sans antibiotique, de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  finale de 25 par tube. La suspension est répartie en cryotubes à raison de 0,9 mL de culture et 0,6 mL de glycérol. Les tubes sont homogénéisés au vortex et conservés à -80°C.

Pour la réalisation des souchiers des micro-organismes portant un marqueur de résistance à un antibiotique, le milieu E est complété avec l'antibiotique à 20 µg/mL.

### **2.6.2. PREPARATION D'UN INOCULUM**

L'inoculum est préparé à partir du souchier contenant des cellules conservées à -80°C dans 40% de glycérol. Un tube contenant 5 mL de milieu E modifié ajusté à pH 7,0 avec une solution d'HCl 10% (v/v) est inoculé par 0,5 mL de suspension bactérienne du souchier. L'ensemble est mis à incuber à 30°C pendant 10 à 14 h sous une agitation de 300 rpm. Puis, le tube est homogénéisé au vortex et la DO<sub>600nm</sub> est mesurée. Une préculture P1 est alors réalisée dans un volume final de 50 mL de milieu E modifié à pH 7,0 contenu dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 mL. Le tout est mis à incuber à 30°C sous une agitation de 140 rpm, la préculture est arrêtée lorsque la souche se situe en début/milieu de phase exponentielle de croissance ( $1 < DO_{600nm} < 5$ ) (Cette première préculture P1 est doublée). Puis, une seconde préculture P2 est réalisée de la même manière que la préculture P1, celle-ci est inoculée à partir de la meilleure fiole de P1 et est doublée. Le volume nécessaire pour démarrer les cultures en fioles est alors centrifugé à 2000 g pendant 10 min à 25°C. Le culot est remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile. La suspension obtenue est centrifugée à nouveau à 2000 g pendant 10 min. Le culot est enfin repris dans de l'eau physiologique stérile. La suspension est alors prête pour l'inoculation.

### **2.6.3. CULTURES EN FIOLES D'ERLENMEYER**

Les expériences durent au maximum 72 h et plusieurs échantillonnages sont effectués sur ces cultures. La DO<sub>600nm</sub> initiale est comprise entre 0,1 et 0,4 DO. Le volume des fioles d'Erlenmeyer est de 500 mL et le volume de milieu nutritif de 100 mL sauf indication. On réalise sur les échantillons prélevés stérilement sous la hotte à flux laminaire les mesures suivantes : un contrôle de la pureté par isolement sur gélose nutritive et gélose Mossel + marqueur antibiotique (50 µg/mL), une mesure de la densité optique à 600 nm, une mesure du pH, une mesure du poids sec et un prélèvement du surnageant de culture pour le dosage des lipopeptides par CLHP : 3 mL de culture sont centrifugés 10 min à 10000 g à 4°C et le surnageant de culture est conservé à -20°C.

## 2.6.4. CULTURES EN FIOLES RAMOS

### 2.6.4.1. DESCRIPTION DU SYSTEME RAMOS

La figure 11 représente le système RAMOS ou «Respiration Activity Monitoring System». Ce système a été développé par le laboratoire du « Department of Biochemical Engineering » de l'Université d'Aix-la-Chapelle en Allemagne, dans l'optique d'assurer une mesure en fioles de la consommation en oxygène et de la production de dioxyde de carbone par le microorganisme et le quotient respiratoire résultant. Les expériences décrites dans ce travail ont été réalisées dans le laboratoire cité ci-dessus.

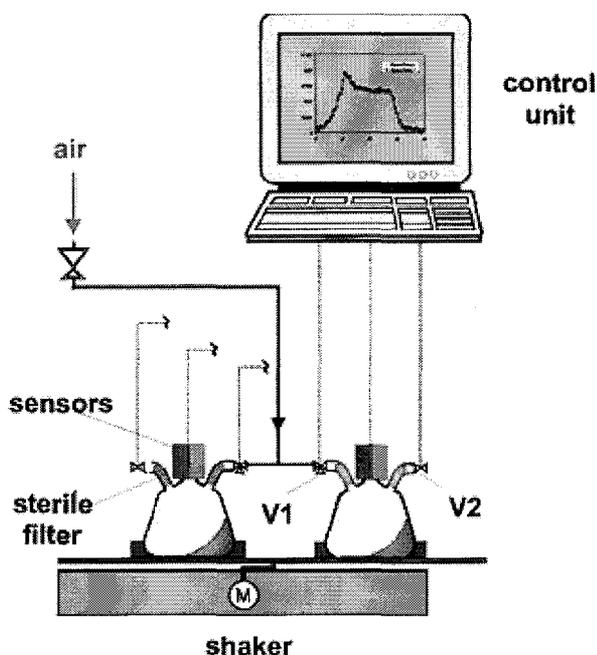


Figure 11 : Le système RAMOS « Respiration Activity Monitoring System » (Anderlei et Büchs, 2001). Le système est composé d'un agitateur orbital, « shaker », disposé dans un incubateur, et sur lequel sont fixées huit fioles équipées de capteurs, « sensors », permettant les mesures d'OTR et de CTR et de six ou 24 fioles « sacrifices », selon la version de l'appareillage

L'agitateur orbital est disposé dans un incubateur. Huit fioles RAMOS équipées de capteurs permettent les mesures sur les gaz, et six fioles « sacrifices », ou 24 selon la configuration, évoluent en parallèle et permettent l'échantillonnage sans affecter l'analyse des

gaz. Les vitesses de consommation d'oxygène et de production en dioxyde de carbone sont mesurées selon un cycle continuellement répété durant la fermentation.

Ce cycle est composé de deux phases : une phase de mesure et une phase dite de rinçage. La pression partielle en oxygène de la phase gazeuse de la fiole est mesurée par un capteur paramagnétique. Au début de la mesure, les valves d'entrée et de sortie du gaz (V1 et V2), munies de filtres stériles, sont fermées. L'activité respiratoire des microorganismes conduit à une diminution de la pression partielle en oxygène dans la phase gazeuse de la fiole. Un ordinateur, «control unit», relié aux fioles de mesure calcule alors le taux de transfert d'oxygène (OTR) selon le changement observé en pression partielle en oxygène et selon la relation avec la constante de Henry :

$p_{O_2} = H * x_{O_2}$  avec H : la constante de Henry =  $4,75.10^4$  atm/fraction molaire et  $p_{O_2} = 0,209$  atm.

Un second capteur mesure, quant à lui, les variations de la pression totale dans la fiole. Le quotient respiratoire peut être alors calculé selon le bilan :

$$QR = \frac{CTR}{OTR}$$

en corrélation avec les variations de la pression totale. A la suite de cette phase de mesure, les valves sont réouvertes et l'air peut circuler de nouveau dans la fiole.

#### 2.6.4.2. CULTURES EN SYSTEME RAMOS

Des cultures de *B. subtilis* ont été réalisées avec le système RAMOS. Les expériences durent au maximum 72 heures et plusieurs échantillonnages sont effectués sur des fioles sacrificielles. La  $DO_{600nm}$  initiale est comprise entre 0.1 et 0.4 DO. Sauf indication, ces cultures sont conduites à une température de 30°C et sous agitation de 155 rpm dans des fioles de 250 mL contenant 25 mL de milieu nutritif complété avec 100 mM de MOPS ajusté à pH 7,0.

### 2.6.5. CULTURES EN MICROPLAQUE

Des cultures en microplaques 96 puits sont réalisées à 28°C et à une agitation de 280 rpm. Le volume de milieu de culture est de 200 µL et l'ensemencement réalisé entre 0,2 et 0,55 DO. Les lectures de DO<sub>600nm</sub> sont réalisées de façon automatisée en fin de culture à l'aide du ThermolabSystem, MRXII (Bio-rad). La pureté de la culture est vérifiée en fin de culture sur un puits de contrôle.

### 2.6.6. CULTURES EN BIOREACTEUR

Le bioréacteur contenant le milieu nutritif estensemencé à l'aide d'une préculture obtenue selon la condition décrite au §2.6.2. La DO<sub>600nm</sub> initiale est comprise entre 0,1 et 0,3 DO. Le bioréacteur utilisé est un Bioflo 3000 (figure 12) avec un volume utile de 5 L (New Brunswick Scientific). Sauf indication contraire, le pH est contrôlé à une valeur de 6,5±0,1 u.pH grâce à l'ajout de solutions de KOH 3M ou de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M. L'électrode pH est calibrée avant autoclavage de la cuve en utilisant des solutions commerciales tamponnées à pH 4,0 et 7,0 et conservées à 4°C. Le processus est conduit à 30 ±0,1°C et la concentration en oxygène dissous pO<sub>2</sub> est contrôlée au-dessus de 10±5% de la concentration à saturation en assujettissant sa valeur à la vitesse de l'agitateur muni de deux turbines de Rushton. L'électrolyte de la sonde à oxygène est renouvelé à chaque expérience. La sonde oxygène est calibrée après autoclavage de la cuve lorsque le milieu de culture atteint la température et le pH de consigne de l'expérience. Le 0 % de pO<sub>2</sub> est obtenu en reliant le câble de la sonde à la masse et le 100 % pO<sub>2</sub> en saturant le milieu en air (1000 rpm et 2 VVM). L'aération est fixée à 0,25 volume d'air par volume de liquide par minute (VVM), soit 0,75 L/min pour 3 L de milieu nutritif. L'air entrant est filtré au travers d'un filtre stérilisant de 0,22 µm. Dans le cas de procédés alimentés, le milieu d'alimentation est amené à l'aide d'une pompe péristaltique calibrée avant chaque expérience. Le logiciel utilisé pour la commande du processus et l'acquisition des données est AFS Biocommand (New Brunswick Scientific). La pureté de la culture est vérifiée en fin de culture. Des échantillons de culture de 10 mL sont régulièrement prélevés et centrifugés et le poids sec est déterminé.

Les gaz entrant et sortant sont analysés afin d'obtenir des données sur la respiration du microorganisme. Un capteur paramagnétique permet l'analyse de l'oxygène et un capteur infrarouge celle du dioxyde de carbone (Xentra 4400, Servomex). L'analyseur s'intègre à un

dispositif multiplé qui permet une analyse séquentielle sur six voies, un séchage des gaz sur membrane Naflon (Permapur) et une calibration automatique.

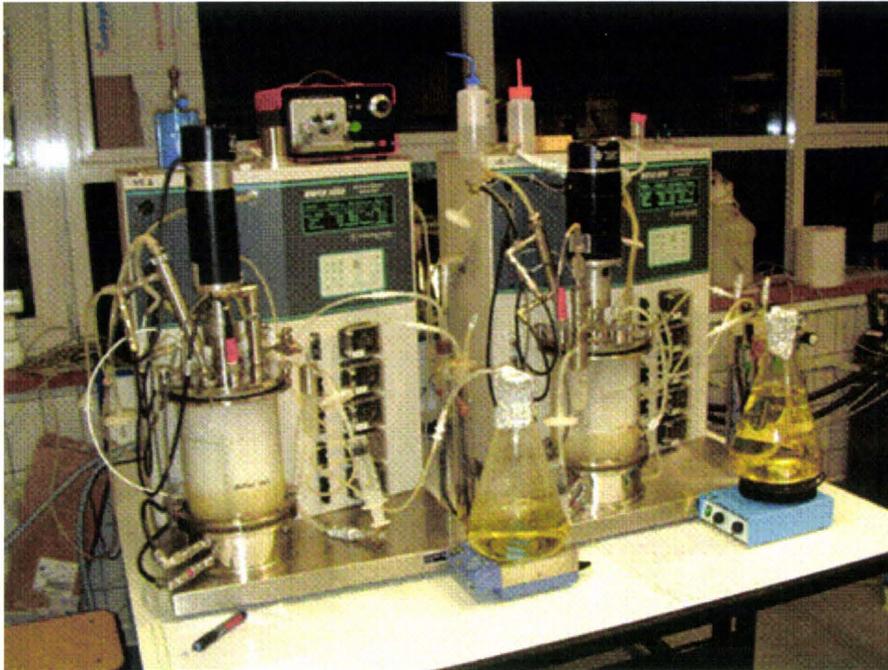


Figure 12 : Exemple d'une culture semi-discontinue de *B. subtilis* en bioréacteurs Bioflo3000

## 2.7. ANALYSES

### 2.7.1. MESURE DE LA DENSITE OPTIQUE A 600 NM

La mesure de DO se fait à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UV mini 1240). L'établissement de la relation DO-CFU/mL a été réalisé à partir de cultures en fioles dans du milieu de Landy modifié ajusté à pH 7,0. Les dénombrements ont été effectués pour différentes valeurs de  $DO_{600nm}$  sur des boîtes de gélose nutritive et ce pour différentes dilutions de culture. Pour chaque dilution effectuée, la suspension bactérienne est étalée à raison de 100  $\mu$ L par boîte et les étalements sont réalisés en triplicat.

### **2.7.2. MESURE DU POIDS SEC**

Le récipient servant à la mesure du poids sec est placé préalablement à 105°C durant 48 h, puis il est refroidi 4 h en dessiccateur avant d'être pesé. 10 mL de culture, préalablement homogénéisés, sont centrifugés à 10 000 g durant 10 min. Les culots sont repris et lavés par 10 mL d'eau déminéralisée et sont de nouveau centrifugés 10 min à 10 000 g. Chaque culot est repris par de l'eau déminéralisée et placé quantitativement dans le récipient préparé. Le tout est placé à 105°C pendant 48 h. La pesée se réalise après un refroidissement de 4 h en dessiccateur sur une balance de précision.

### **2.7.3. MESURE DU PH**

Les mesures de pH ont principalement été effectuées à l'aide du pH mètre Metrohm 744.

### **2.7.4. PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES ET ANALYSES**

#### **2.7.4.1. PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES**

L'extraction des lipopeptides est réalisée sur des cartouches de 1 g de gel C18 maxiclean (Alltech). La cartouche d'1 g d'ODS est conditionnée avec du méthanol 100% (20 mL au premier passage puis 8 mL). Puis, la cartouche est rincée par 8 mL d'eau milli-Q. 1 mL de surnageant de culture dont le pH est égal à 6,5 +/-1 u.pH, est alors chargé sur la colonne. La cartouche est lavée avec 8 mL d'eau milli-Q, puis est lavée avec 8 mL de méthanol 50%. Après séchage de la cartouche avec 20 mL d'air, les lipopeptides sont élués par 4 mL de méthanol 100%. L'éluat est porté à sec à l'aide d'un concentrateur sous vide. L'échantillon est par la suite repris dans 200 µL de méthanol 100% à 4°C pour permettre le dosage en CLHP.

#### **2.7.4.2. ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)**

L'échantillon est analysé grâce à un système complet de CLHP de la marque Waters (Online Degaser, 717 Autosampler, 660S Controller, 626 Pump, 2996 PhotoDiodeArray) en employant une colonne C18 (5 µm, 250 x 2.5 mm, VYDAC 218 TP). Deux dosages sont effectués. Le premier dosage est celui des iturines : 5 µL d'échantillon purifié sont injectés et

confrontés à un standard iturine à 500 mg/L (Sigma) selon un débit de 0,6 mL/min. L'élution est réalisée en mode isocratique à l'aide d'un solvant eau/ acétonitrile/ acide trifluoroacétique 60/40/0,1 (v/v/v). Le second dosage est celui des surfactines. 10 µL d'échantillon purifié sont injectés et confrontés à un standard surfactine à 500 mg/L (Sigma) selon un débit de 0,6 mL/min. L'élution est réalisée en mode isocratique à l'aide d'un solvant eau/ acétonitrile/ acide trifluoroacétique 20/80/0,1 (v/v/v).

Le temps de rétention et la dérivée seconde du spectre entre 200 et 400 nm de chaque pic (barrette de diodes, PDA 2996, Waters) sont analysés automatiquement à l'aide du logiciel Millennium pour l'identification des molécules éluées.

#### 2.7.4.3. ANALYSES PAR CLHP SEMI-PREPARATIVE

L'échantillon est préparé en appliquant le protocole de purification décrit au § 2.7.4.1. en employant des cartouches de gel C18 maxi-clean (Alltech) de 10 g. L'utilisation de cartouches de 10 g permet de charger 10 mL de surnageant de culture au lieu de 1 mL précédemment. Tous les volumes sont multipliés par un facteur 10, sauf les volumes de méthanol. Le volume minimum de méthanol pouvant être utilisé pour le conditionnement de la cartouche puis l'élution des lipopeptides est de 10 mL. L'échantillon est chargé manuellement (100 µL) dans le système d'injection de la CLHP semi-préparative de marque Waters (660 Controller, 626 Pump, 486 Absorbance Detector). La colonne employée est une C18 (5 µm, 300 x 10 mm, ACE). L'élution est réalisée à un débit de 3 mL/min selon le gradient suivant :

Temps (min)	Tampon A (%)	Tampon B (%)
0	65	35
4	65	35
54	50	50
60	0	100
61	65	35
65	65	35

Les solvants utilisés sont les suivants : le solvant A composé d'eau et d'acide trifluoroacétique, 99,9/ 0,1 (v/v) et le solvant B composé d'acétonitrile et d'acide trifluoroacétique, 99,9/ 0,1 (v/v).

**2.7.4.4. ANALYSES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF**

Les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker Ultraflex) sont réalisées en fonction des besoins à partir : soit de surnageants de culture, soit d'échantillons purifiés sur cartouche ODS (Alltech) ou soit d'échantillons purifiés sur cartouche ODS (Alltech) puis par CLHP semi-préparative. Le solvant TA est préparé en réalisant un mélange CH<sub>3</sub>CN/ eau/ acide trifluoroacétique, 33/67/0,1 (v/v/v). Le tampon CHCA est une solution saturée en acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dans du tampon TA. Il est préparé en récupérant le surnageant après centrifugation du mélange acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique / tampon TA. Les échantillons à analyser sont préparés en mélangeant 1 µL de l'échantillon à 9 µL de CHCA. La solution d'échantillon déposée pour l'analyse MALDI-TOF représente un volume de 0,5 µL. Le séchage est réalisé à l'air libre. La calibration des masses est réalisée avec un mélange de peptides standards.

Lipopeptide	Mass value		
	M+H <sup>+</sup>	M+Na <sup>+</sup>	M+K <sup>+</sup>
Surfactin C <sub>13</sub>	1008.66	1030.64	1046.61
Surfactin C <sub>14</sub>	1022.67	1044.66	1060.63
Surfactin C <sub>15</sub>	1036.69	1058.67	1074.65
Mycosubtilin C <sub>15</sub>	1057.57	1079.55	1095.52
Mycosubtilin C <sub>16</sub>	1071.58	1093.56	1109.54
Mycosubtilin C <sub>17</sub>	1085.6	1107.58	1123.55

Les masses calculées des ions [M+H<sup>+</sup>], [M+Na<sup>+</sup>], [M+K<sup>+</sup>] des différents homologues de mycosubtiline et de surfactine sont précisées ci-dessus.

**2.7.4.5. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE**

La chromatographie sur couche mince a été utilisée pour détecter la présence de lipopeptide lorsque les techniques d'extractions sur cartouche ODS n'étaient plus applicables, par exemple en raison des interférences dues à la présence de composés hydrophobes telles que des huiles végétales. 100 µL de chaque échantillon à analyser sont déposés à 1 cm du bord de la couche mince. Le solvant de migration est un mélange de 50 % de chloroforme et de 50 % de méthanol. La migration a alors lieu par capillarité. Les composés migrent en fonction de leur hydrophobicité. Une tache hydrophobe apparaît après révélation à l'eau. La

lecture est confirmée sous UV. Dans ces conditions de solvant de migration utilisées, la valeur du rapport frontal  $R_f$  est de 0,8 pour la surfactine et 0,6 pour la mycosubtiline.

### **2.7.5. DOSAGE DU GLUCOSE, DE L'ACIDE ACÉTIQUE, LACTIQUE ET OXALIQUE EN CLHP**

Ce dosage se réalise par chromatographie liquide à haute performance, sur colonne Fast fruit juice (co-polymère de sulfonate et styrène-divinylbenzène, 7  $\mu\text{m}$ , 7,8 x 150 mm, Waters). Une colonne de garde en co-polymère de sulfonate et de styrène-divinylbenzène (Grundy *et al.*, 1993) est placée en amont de la colonne. Les conditions opératoires sont les suivantes: le débit est fixé à 0,8 mL/min, la température à 65°C, l'éluant utilisé est une solution d' $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,005 M, le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$ , la détection est réalisée à l'aide d'un réfractomètre et le temps d'une analyse est de 10 min. L'échantillon ne demande aucun prétraitement mis à part une filtration sur filtre 0,45  $\mu\text{m}$ . La CLHP est constituée d'une pompe constaMetric 3200 (LDC analytical), d'un four REG 101 (BAEI), d'un détecteur réfractometor IV (TSP) et d'un intégrateur DataJet (TSP).

### **2.7.6. DOSAGE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE**

#### **2.7.6.1. PAR CLHP**

L'acide L-glutamique a été dosé en CLHP dans le cadre d'une collaboration au Laboratoire de Chimie Biologique Industrielle du Professeur Paquot de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. L'appareillage utilisé est un Biochrom 20 plus Amino Acid Analyser (Biochrom).

#### **2.7.6.2. PAR KIT ENZYMATIQUE**

Le dosage est basé sur l'oxydation de l'acide L-glutamique en 2-oxoglutarate en présence de glutamate déshydrogénase (GIDH). Cette réaction s'accompagne d'une réduction du  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}, \text{H}^+$ . Après ajout de chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) et en présence de la diaphorase, le cofacteur réduit  $\text{NADH}, \text{H}^+$  est réoxydé avec formation de formazan. L'apparition du formazan est suivie en spectrophotométrie à 492 nm. L'eau utilisée pour les dosages enzymatiques est de l'eau milliQ. Le kit (Boehringer Mannheim) doit être utilisé à une température comprise entre 20 et 25°C. Le développement de la réaction est réalisé à

l'obscurité car l'INT est photosensible. Après incubation 15 min, la réaction est bloquée dans de la glace.

Un volume de 1,2 mL d'échantillon de milieu de culture est centrifugé 5 min à 10000 g. Le surnageant est conservé, transféré dans un tube Eppendorf, puis agité vigoureusement au vortex pendant 1 min. Il est ensuite placé à 80°C au bain-marie pendant 15 min, centrifugé 5 min à 10 000 g et récupéré dans un bécher. Un mL d'échantillon est ensuite ajouté à 1 mL d'acide perchlorique 1M. Le pH de l'échantillon est ajusté à 8, goutte à goutte, avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 M puis 0.1 M. Le niveau est ajusté à 10 mL avec de l'eau dans une fiole jaugée. Les mélanges décrits ci-après sont directement préparés dans les microcuvettes de spectrophotométrie.

	Eau milliQ (mL)	Solution 1 (mL)	Solution 2 (mL)	Echantillon (mL)	Suspension 3 (mL)
<b>Blanc</b>	2,0	0,6	0,2	0	0,2
<b>Test</b>	1,8	0,6	0,2	0,2	0,2

Une fois le mélange réalisé, il est mis à incuber 2 min à température ambiante. La lecture de la DO<sub>1</sub> à 492 nm se fait contre une cuve remplie d'eau. La lecture de la DO<sub>1</sub> à 492 nm est effectuée 2 min plus tard. Si la valeur lue a changé de plus de 0,010 DO, alors l'échantillon doit être traité avec une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour diminuer la concentration des substances réductives. Toujours dans les mêmes microcuvettes, 0,030 mL de la solution 4 sont ajoutées. Après une incubation de 15 min à température ambiante et à l'obscurité, la réaction est bloquée dans de la glace et la lecture de la DO<sub>2</sub> est réalisée. Les calculs permettant d'obtenir la concentration en acide glutamique sont les suivants :

$$\Delta DO_{L\text{-acide-glutamique}} = (DO_2 - DO_1)_{\text{Test}} - (DO_2 - DO_1)_{\text{Blanc}}$$

avec  $\Delta DO_{L\text{-acide-glutamique}} > 0,100$  DO pour un résultat précis.

$$C_{L\text{-acide-glutamique}} = (3,030 * 147,13 * \Delta DO_{L\text{-acide-glutamique}}) / (\epsilon \cdot l * 0,2 * 1000)$$

Et  $\epsilon \cdot l$  à 492 nm = 19,9 L.mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

Les résultats sont corrigés par les dilutions successives de l'échantillon.

## **2.8. TESTS D'ACTIVITES BIOLOGIQUES**

### **2.8.1. POUVOIR ANTIFONGIQUE**

Les tests d'activités antifongiques sont réalisées par dilutions successives de l'antibiotique en milieu liquide (Besson *et al.*, 1979). Les cultures en microplaques 96 puits, voir § 2.6.5., sont réalisées dans un milieu riche : glucose, 40 g/L ; peptone, 10 g/L ; extrait de levure, 2g/L ; pH=7.2. L'ensemencement est réalisé à une  $DO_{600nm}$  de 0.55 et la lecture d'absorbance se fait à 24 h.

### **2.8.2. POUVOIR HEMOLYTIQUE**

Le test d'activité hémolytique est réalisé sur milieu LB gélosé avec ajout de sang de cheval à 5% (AES laboratoires). Le test est positif lorsque un halo translucide est visible à la périphérie de la colonie.

CHAPITRE 3 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES  
MYCOSUBTILINES ET EFFET DES CONDITIONS  
ENVIRONNEMENTALES SUR LEUR SYNTHESE PAR  
*B. SUBTILIS*

### **3. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES MYCOSUBTILINES ET EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LEUR SYNTHÈSE PAR *B. SUBTILIS***

Comme il l'a été précisé dans le § 1.6., de nombreuses expériences sont reportées dans la littérature sur l'effet des conditions de culture sur la production de lipopeptides, et notamment sur les iturines. Ces résultats varient parfois en fonction des souches utilisées d'où l'intérêt de vérifier les conditions de culture pour la souche *B. subtilis* ATCC 6633. Dans le cadre de cette étude, de nombreux paramètres ont été étudiés : milieux de culture, source de carbone et d'azote, pH, taux de transfert en oxygène, concentration en fer. Seuls les paramètres présentant un intérêt pour l'étude de la productivité et plus particulièrement de la sélectivité, seront présentés dans ce chapitre.

Afin de guider le travail sur la productivité et la sélectivité de la biosynthèse de mycosubtiline, un travail essentiel a consisté à établir la CMI des différentes isoformes de mycosubtiline vis-à-vis de microorganismes choisis. Ce travail préliminaire doit déterminer l'intérêt des différentes isoformes en prévision du développement d'applications pouvant faire suite à ce travail.

#### **3.1. TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DES ISOFORMES DE MYCOSUBTILINE**

##### **3.1.1. INTRODUCTION**

Le tableau 3 présenté dans le chapitre 1 montre que la mycosubtiline est le lipopeptide iturinique qui a le pouvoir antifongique le plus important. Pour l'iturine A, l'activité antifongique est améliorée lorsque la longueur de la chaîne carbonée augmente. Le type d'isoforme semble aussi avoir un rôle (Hbid, 1996).

##### **3.1.2. PURIFICATION DES ISOFORMES DE MYCOSUBTILINES**

Un surnageant de culture de *B. subtilis* ATCC 6633 a été purifié puis concentré jusqu'à obtenir une solution mère à 250 mg/L. L'injection selon le protocole décrit au § 2.7.4.3. a permis d'obtenir le chromatogramme présenté sur la figure 13.

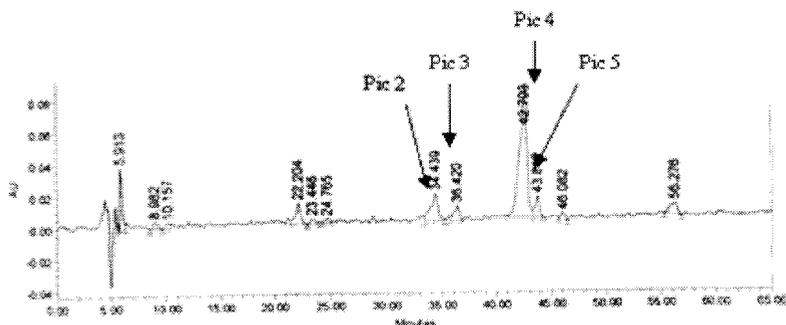


Figure 13 : Chromatogramme issu de l'analyse en CLHP semi-préparative d'une solution concentrée en mycosubtiline (250 mg/L). L'échantillon analysé correspond à un surnageant de culture purifié sur une cartouche ODS de 10 g.

Les fractions correspondant aux pics 2, 3, 4 et 5 ont été récoltées au cours des injections successives de la solution mère de mycosubtiline. L'identification des pics majoritaires détaillée au § 3.4.1. a permis de faire correspondre le pic 2 à la mycosubtiline *isoC*-16, le pic 4 à la mycosubtiline *anteisoC*-17 et le pic 5 à la mycosubtiline *isoC*-17. La concentration par speed-vac des fractions récoltées a permis l'obtention de solutions concentrées dans du méthanol des différentes isoformes de mycosubtiline produites par ATCC 6633.

La pureté (>98%) de ces solutions concentrées a été vérifiée en CLHP analytique selon le protocole décrit au § 2.7.4.2.

### 3.1.3. TESTS D'ACTIVITE ANTIFONGIQUE ET DETERMINATION DE LA CMI

La détermination de la CMI de la solution mère concentrée vis-à-vis de différents microorganismes est réalisée en microplaque selon les protocoles décrits aux § 2.6.5. et 2.8.1. Le tableau 11 présente les résultats des tests réalisés par dilutions successives (Besson *et al.*, 1979).

Tableau 11 : Détermination de la CMI de la solution mère de mycosubtiline vis-à-vis de différents microorganismes. Le témoin (Tem.) est réalisé en l'absence du composé testé. Chaque puits testé est comparé à un puits de contrôle réalisé en présence d'un volume de méthanol identique.

	64 $\mu\text{M}$	32 $\mu\text{M}$	16 $\mu\text{M}$	8 $\mu\text{M}$	4 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	Tém.	Répétitions
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	*2
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	*2
<i>Pichia pastoris</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	*2
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	*4
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	*2

+ : croissance visible de la souche à 24h de culture.

- : pas de croissance de la souche à 24h de culture.

Les concentrations minimales inhibitrices déterminées pour la solution mère de mycosubtiline vis-à-vis des différents micro-organismes à partir des résultats du tableau 11 sont les suivantes :

- *Aspergillus niger* : 8  $\mu\text{mol/L}$ ,
- *Botrytis cinerea* : 8  $\mu\text{mol/L}$ ,
- *Candida albicans* : 16  $\mu\text{mol/L}$ ,
- *Pichia pastoris* : 32  $\mu\text{mol/L}$ ,
- *Saccharomyces cerevisiae* : 8  $\mu\text{mol/L}$ .

Comme attendu, la solution mère de mycosubtiline a une forte action sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Besson *et al.*, 1979) (Besson et Michel, 1989) (Latoud *et al.*, 1990). La valeur de CMI de 8  $\mu\text{M}$  est conforme aux valeurs de 10  $\mu\text{M}$  reportées par ces auteurs. La solution mère de mycosubtiline présente une action du même ordre de grandeur, 8  $\mu\text{M}$ , sur *Botrytis cinerea* et sur *Aspergillus niger*. En revanche, elle semble sensiblement moins active sur *Candida albicans*, 16  $\mu\text{M}$  et sur *Pichia pastoris*, 32  $\mu\text{M}$ .

Compte tenu des faibles quantités d'isoformes de mycosubtiline disponibles, une seule souche, *Botrytis cinerea*, a été choisie pour l'étude visant à déterminer la CMI.

Tableau 12 : Valeurs des CMI ( $\mu\text{mol/L}$ ) des différentes isoformes de mycosubtiline vis-à-vis de *Botrytis cinerea*

CMI ( $\mu\text{mol/L}$ )	Myc isoC-16	Myc n-C-16	Myc anteisoC-17	Myc isoC-17
<i>Botrytis cinerea</i>	19	18	8	26

Les résultats indiquent que l'isoforme *anteisoC-17* est la plus active vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. La valeur de la CMI pour cette isoforme, 8  $\mu\text{mol/L}$ , est identique à celle obtenue pour la solution mère. Ce phénomène pourrait s'expliquer simplement car la proportion de mycosubtiline *anteisoC-17* est élevée dans la solution mère (80%). Une autre explication serait l'effet de synergie entre différentes isoformes de mycosubtilines. Ce phénomène a déjà été observé à l'égard d'autres lipopeptides tels que la surfactine et l'iturine A (Maget-Dana *et al.*, 1992).

#### 3.1.4. EN BREF

L'isoforme *anteisoC-17* de la mycosubtiline est la plus active vis-à-vis de *Botrytis cinerea*. Il semble que la longueur de la chaîne carbonée de l'acyl ne soit pas le seul paramètre qui joue un rôle dans l'activité antifongique de la mycosubtiline. En effet, l'isoforme *anteisoC-17* a une activité antifongique significativement plus élevée que l'isoforme *isoC-17* vis-à-vis de *B. cinerea*. L'activité antifongique de l'isoforme *anteisoC-17* semblant être identique à celle de la solution mère, il se pourrait que les CMI de l'isoforme *anteisoC-17* soit de l'ordre de 8  $\mu\text{M}$  vis-à-vis de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Aspergillus niger* et de 16  $\mu\text{M}$  vis-à-vis de *Candida albicans*. Il serait extrêmement intéressant dans la suite du travail d'étudier la sélectivité de la biosynthèse de mycosubtiline menant à l'isoforme *anteisoC-17*.

### 3.2. CHOIX DU MILIEU DE CULTURE DE REFERENCE

#### 3.2.1. INTRODUCTION

Trois milieux de culture principaux permettant la production de lipopeptides par *B. subtilis* ATCC 6633 sont décrits dans la littérature (Duitman *et al.*, 1999) : le milieu de Landy (§ 2.2.1.), le milieu ACS (§ 2.2.2.) et le milieu DSM (§ 2.2.3.). La synthèse de mycosubtiline et de surfactine a été étudiée afin d'identifier lequel d'entre eux deviendra le milieu de référence pour la suite des expérimentations.

#### 3.2.2. TESTS DES MILIEUX DE LANDY, ACS ET DSM

La croissance et le pH ont été suivis durant des cultures en fioles d'Erlenmeyer de *B. subtilis* ATCC 6633 comme décrit au § 2.6.3. Les profils de croissance et d'évolution du pH sont représentés sur la figure 14.

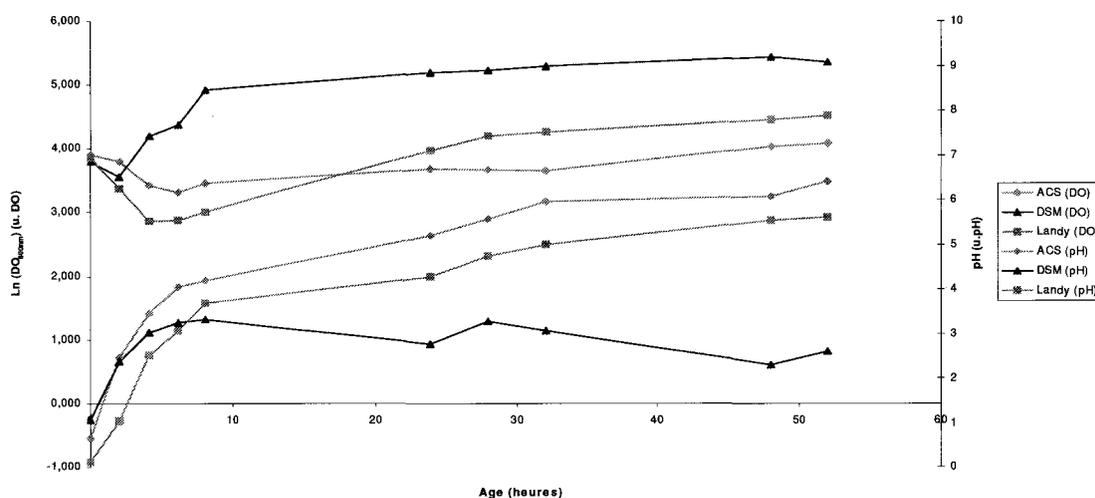


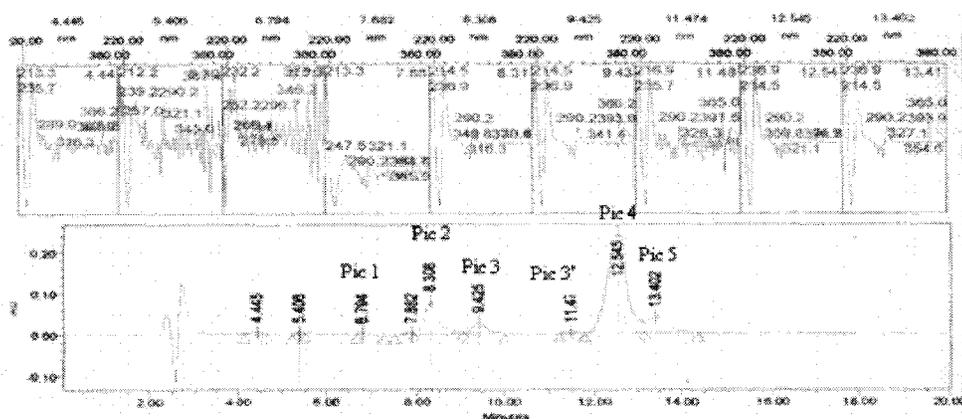
Figure 14 : Evolution du logarithme de la densité optique à 600 nm et du pH lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer de *B. subtilis* ATCC 6633 sur les milieux de Landy, ACS et DSM ajustés à pH 7,0.

### 3. Activité biologique et effet des conditions environnementales

La croissance est comparable sur milieu ACS et milieu de Landy avec cependant un niveau de biomasse 1,8 fois plus important en fin de culture sur milieu ACS. Cette tendance s'explique car la concentration en dextrose est cinq fois plus élevée dans le milieu ACS. La croissance limitée de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu DSM s'explique car ce milieu est spécifique à la sporulation.

Les profils d'évolution du pH des milieux de Landy et ACS sont de nouveau comparables. Une acidification probablement liée à la production d'acides organiques lors de l'utilisation du glucose comme source de carbone est suivie d'une alcalinisation démarrant lorsque la cellule reconsume ces mêmes acides ou bascule sur la consommation de l'acide glutamique (milieu de Landy) ou de l'acide citrique (milieu ACS). Cependant, les variations de pH sont plus faibles avec le milieu ACS. Concernant le milieu DSM, une brève chute de pH se produit rapidement, directement suivie par une forte remontée de celui-ci qui se stabilise aux environs de pH 9. Cette montée de pH s'explique car l'unique source de carbone de ce milieu est la tryptone. La consommation de ce substrat comme source de carbone s'accompagne classiquement d'une production d'ammoniaque et provoque l'alcalinisation du milieu de culture.

La figure 15a présente deux exemples de chromatogrammes issus de l'analyse en CLHP des mycosubtilines et des surfactines réalisées comme il a été décrit au § 2.7.4.2. Les résultats sont obtenus après injection des surnageants purifiés, voir § 2.7.4.1., d'une culture de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy.



### 3. Activité biologique et effet des conditions environnementales

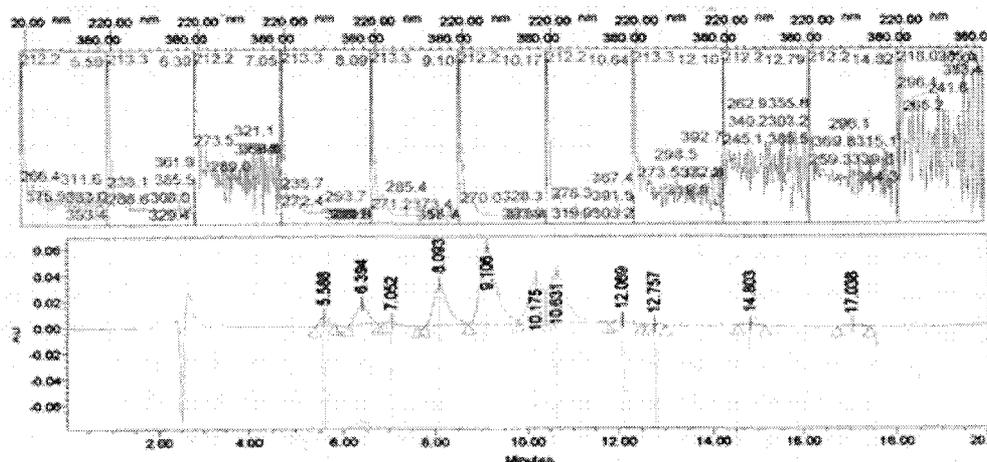


Figure 15a : Chromatogrammes issus de l'analyse en CLHP des lipopeptides produit par *B. subtilis* ATCC 6633 après 52 h de culture en fioles dans le milieu de Landy. Les échantillons analysés correspondent aux surnageants de culture purifiés sur cartouches ODS. Les profils de la dérivée seconde du spectre d'absorbance (220-380 nm) est donné pour chaque pic. En haut : analyse des mycosubtilines. En bas : analyse des surfactines.

Les deux familles de lipopeptide produites par ATCC 6633 sont identifiées grâce à la spécificité de leur signal en dérivée seconde. Il est à noter que cette spécificité est plus marquée pour la famille des mycosubtilines (figure 15a, en haut) que pour celle des surfactines (figure 15a, en bas). Les aires des pics identifiés sont additionnées afin de calculer la concentration totale pour chaque famille. L'identification des isoformes de mycosubtiline représentées par les pics 1, 2, 3, 4 et 5 sera détaillée au § 3.4.1.

Les différents échantillons ont également été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF selon le protocole donné au § 2.7.4.4. Un exemple de résultat est présenté dans la figure 15b afin de déterminer la longueur des chaînes carbonées des homologues de mycosubtilines produits par ATCC 6633.

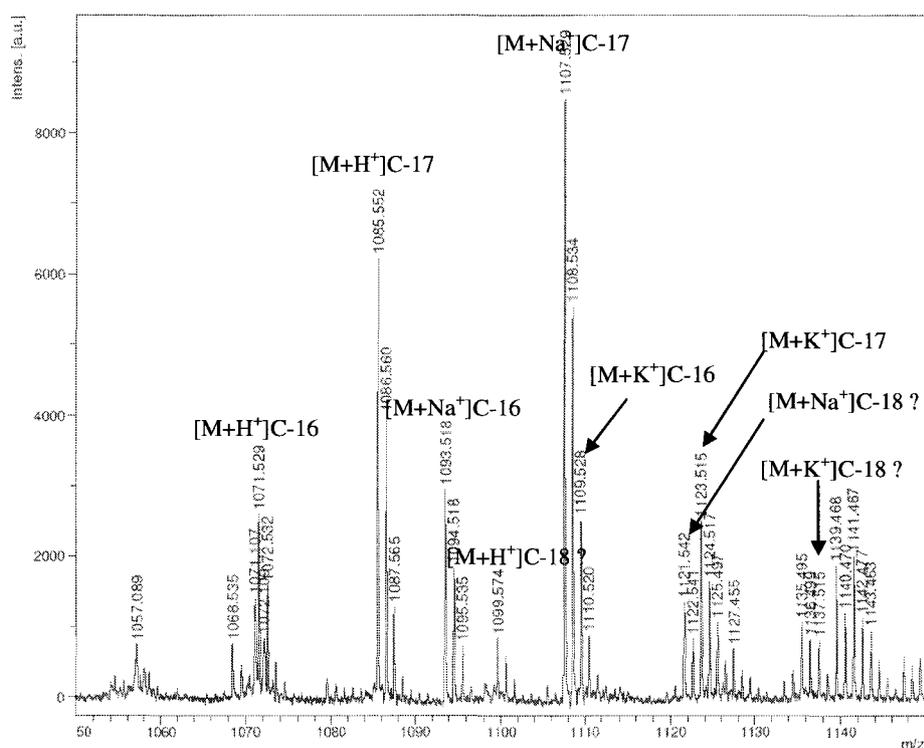


Figure 15b : Spectre de masse MALDI-TOF provenant d'un surnageant pré-purifié sur colonne C18 d'une culture de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy.

Les pics correspondants aux rapports  $m/z$  de 1109,528 et 1123,515 sont à rapprocher des valeurs théoriques des rapports  $m/z$  des mycosubtilines C-16  $[M+K^+]$  et C-17  $[M+K^+]$ . Aucune mycosubtiline C-14 ou C-15 n'est détectable. La plupart des autres pics correspondent aux formes  $[M]$ ,  $[M+H^+]$  ou  $[M+Na^+]$  des différents homologues de mycosubtilines données au § 2.7.4.4. L'analyse du spectre de masse révèle également la présence d'une molécule avec une masse supérieure de 14 uma. Il pourrait s'agir d'un variant de mycosubtiline dans lequel un acide aminé est substitué par un autre, la thréonine à la place de la sérine par exemple, d'une mycosubtiline C-18 ou encore d'une mycosubtiline modifiée par les conditions de purification, comme une méthylation. Ce type de résultat a déjà été obtenu, dans d'autres conditions de purification des lipopeptides pour l'iturine E (Besson et Michel, 1987).

La figure 16 présente les différentes productions des mycosubtiline et surfactine obtenues dans les trois milieux étudiés après 52 h de culture.

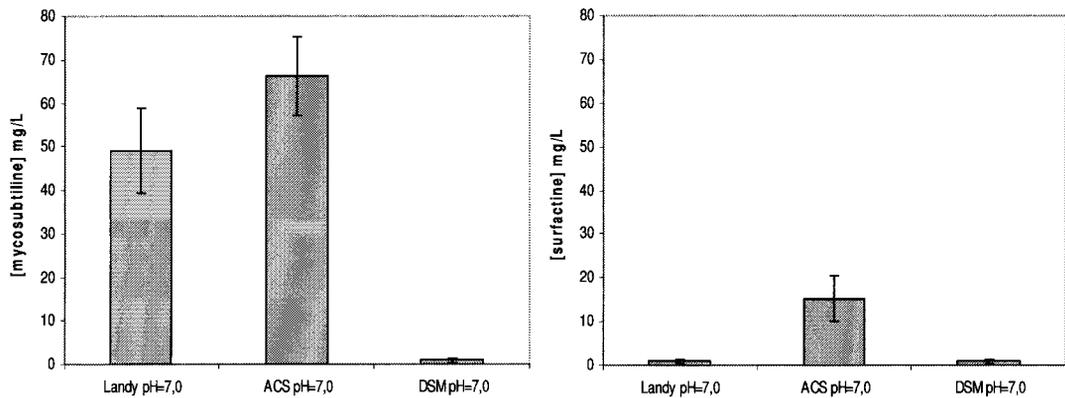


Figure 16 : Concentrations en mycosubtiline et surfactine après 52 h de culture en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 dans les milieux DSM, ACS et Landy. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne.

Le milieu ACS permet la production de mycosubtiline la plus importante, vient ensuite le milieu de Landy. La production de mycosubtiline dans le milieu DSM se trouve sous la limite de détection de l'appareillage utilisé (<0,5 mg/L). La quantité de surfactine produite est très faible sur milieu de Landy et DSM. Par conséquent, les surfactines n'ont pas pu être détectées sur l'exemple de spectre de masse MALDI-MS.

Sur le milieu ACS, la production de biomasse est plus importante que sur le milieu de Landy, le pH varie de façon moins importante et la production globale de lipopeptides y est plus importante. Cependant, sur le milieu de Landy, le rapport quantité de mycosubtiline sur quantité de surfactine y est supérieur, la production de lipopeptides par unité cellulaire y est plus importante.

Les niveaux de production différents de la production de mycosubtiline et de surfactine obtenus avec des milieux de culture différents indiquent une régulation différente de leur synthèse. Duitman et al. (2007) ont, en effet, démontré que les 2 peptides non ribosomiaux synthétisés par ATCC 6633 ne sont pas régulés par les mêmes mécanismes. Il est connu que ComA est impliqué dans le mécanisme global de transduction du signal du

chorum-sensing qui agit comme régulateur de l'expression *srf* (Nakano et Zuber, 1991), le gène qui code pour la surfactine synthétase responsable de la synthèse de la surfactine. Pourtant les études réalisées avec un mutant d'ATCC 6633  $\Delta comA$  ne montrent aucun effet de l'absence de ComA sur l'expression du gène *myc* codant pour la mycosubtiline synthétase responsable de la synthèse de surfactine.

Le milieu de Landy apparaît comme étant le milieu le mieux adapté pour atteindre les objectifs poursuivis. Il conviendrait toutefois de pouvoir réduire les variations de pH.

### **3.3. INFLUENCE DU PH**

#### **3.3.1. CULTURE EN FIOLES SUR MILIEU DE LANDY TAMPONNE**

##### **3.3.1.1. EN PRESENCE DE MOPS 100 MM**

Le milieu de Landy ayant été choisi comme référence, l'effet de l'ajout d'un tampon zwitterionique permettant une limitation des variations du pH au cours de la culture a été testé. La condition témoin est comparée à une condition additionnée de tampon MOPS pH 7,0 à une concentration de 100 mM, voir le § 2.2.1.4. Outre le suivi de la croissance et du pH, la cinétique de consommation du glucose, de l'acide glutamique et les cinétiques de production du lactate, de l'acétate, de l'oxalate et des mycosubtilines ont été étudiées. Les différents dosages sont décrits aux § 2.7.5.

La figure 17 montre les profils d'évolution de la croissance de *B. subtilis* ATCC 6633 ainsi que ceux du pH du milieu de Landy en présence, ou non, de MOPS à une concentration de 100 mM.

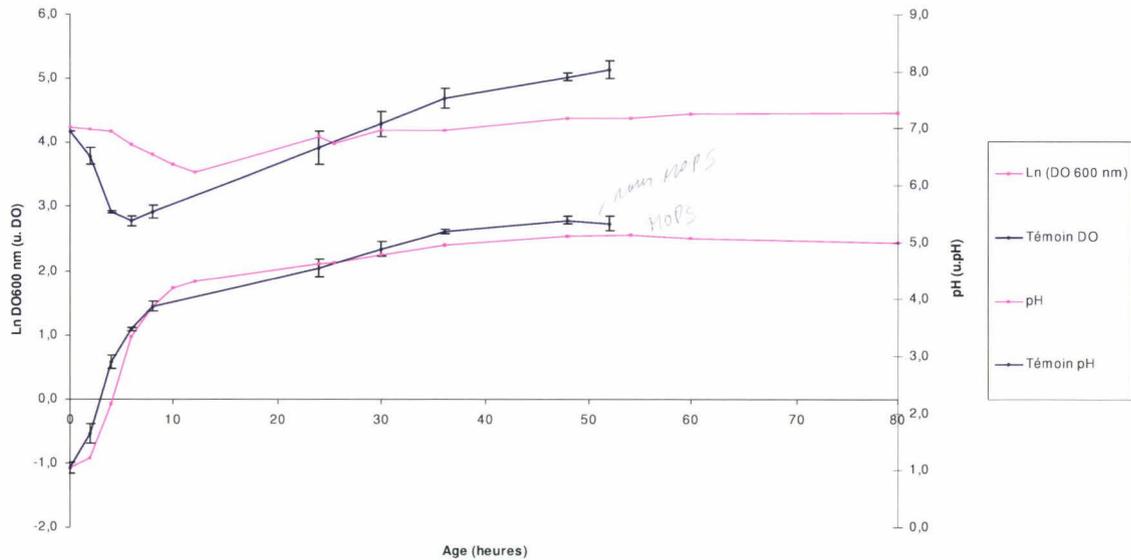


Figure 17 : Evolution du logarithme de la DO à 600 nm et du pH au cours de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 dans le milieu de Landy et le milieu de Landy tamponné à pH 7,0 par du MOPS à une concentration de 100 mM. La moyenne est calculée sur les résultats obtenus à partir trois cultures ayant été inoculées à des niveaux de biomasse identiques. Les barres d'erreur représentent l'écart-type à la moyenne.

La courbe de croissance de la condition témoin révèle quatre phases. D'abord la phase de latence, quasi-inexistante, suivie d'une phase de croissance rapide accompagnée d'une forte acidification. Puis la croissance montre un ralentissement entre 4 et 8 h qui se traduit par un ralentissement de l'acidification. Cette croissance ralentie correspond à un changement de métabolisme probablement lié à une limitation par un des substrats, au passage de consommation d'une source carbonée à une autre, à une inhibition par un des produits ou à un mauvais couplage énergétique en raison de la valeur basse du pH proche de 5,3. Enfin, la quatrième zone traduit la suite de la croissance, beaucoup plus lente, accompagnée d'une lente remontée du pH.

Les profils de croissance sont comparables entre les deux conditions. Le MOPS concentré à 100 mM n'influence donc pas le développement du microorganisme. Le profil d'évolution du pH montre une variation de 0,5 unité pH autour du point de consigne et la

chute du pH durant les premières heures est mieux maîtrisée. Ce résultat étant satisfaisant, une analyse physiologique plus poussée est réalisée afin de mieux caractériser la culture. La figure 18 présente l'évolution de la consommation du glucose ainsi que de l'apparition de l'acétate et du lactate. La présence d'oxalate n'a pu être mise en évidence.

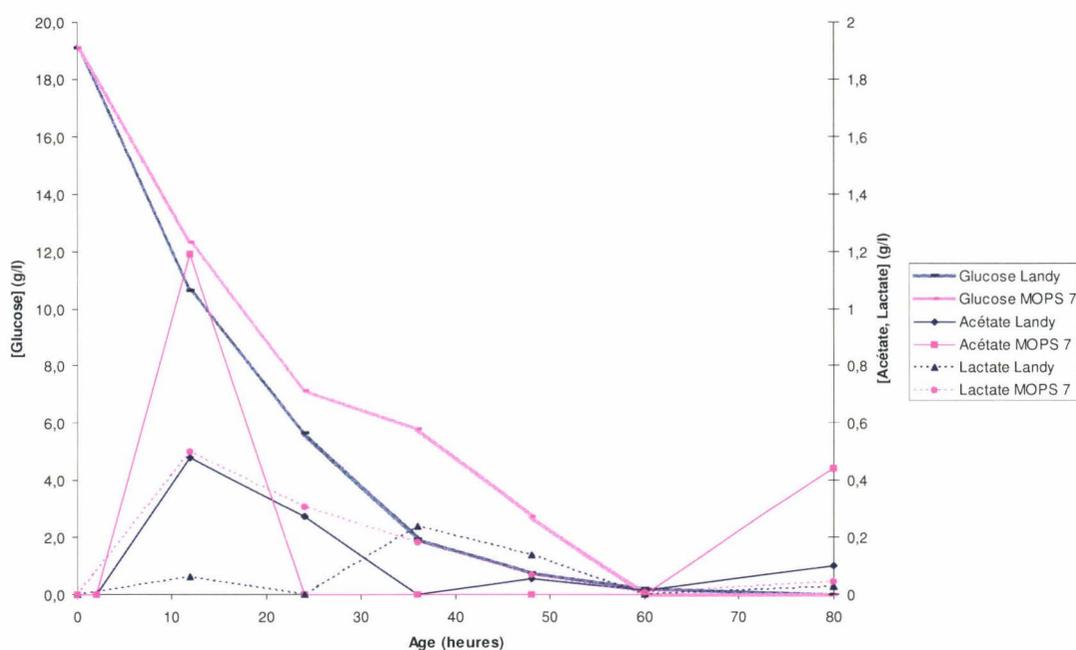


Figure 18 : Evolution de la consommation du glucose, de l'apparition de l'acétate et du lactate au cours de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy et milieu de Landy tamponné à pH 7,0 par du MOPS à une concentration de 100 mM.

Les résultats présentés sur la figure 18 sont issus d'analyses en CLHP réalisées comme décrit au § 2.7.5. Les temps de rétention  $T_R$  des composés analysés sont les suivants :  $T_R$  du glucose : 3,6 min,  $T_R$  de l'acide lactique : 4,7 min,  $T_R$  de l'acide acétique : 5,6 min. La vitesse de consommation du glucose est un peu ralentie après 24 h dans le milieu de Landy tamponné. Au niveau de l'apparition de l'acétate, le maximum apparaît sur les courbes dans les deux cas à 12 h de culture. Ce maximum est trois fois plus élevé et la reconsommation de cet acide se réalise plus vite pour le milieu tamponné. Quant à l'acide lactique, les niveaux de production sont similaires. Le maximum est atteint après 12 h pour le milieu tamponné et après six heures pour le milieu de Landy. D'autres molécules pourraient être responsables de

la phase d'acidification, notamment l'acide pyruvique mais il n'a pu être dosé à l'aide de la colonne utilisée. La reconsumption des acides organiques se poursuit pour les deux milieux jusqu'à 60 h de culture. Ces résultats montrent dans un premier temps un parallélisme entre la chute du pH et l'apparition de ces acides et dans un deuxième temps entre l'augmentation du pH et leur reconsumption. Le suivi de la consommation de l'acide glutamique est donné dans le tableau 13.

Tableau 13 : Concentration en g/L de l'acide glutamique dans le milieu de Landy et milieu de Landy tamponné à un pH de 7,0 par du MOPS à une concentration de 100 mM lors de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633.

	<b>Landy</b>	<b>Landy MOPS 100 mM à pH 7,0</b>
Age (h)	[Acide glutamique] (g/L)	[Acide glutamique] (g/L)
10	2,992	3,283
30	1,438	1,999
80	0,024	0,075

La consommation d'acide glutamique est concomitante de la consommation du glucose. Elle paraît légèrement plus rapide dans le cas du milieu de Landy. Mais trop peu de points sont disponibles pour observer une réelle différence dans la cinétique de consommation. La cinétique de production des mycosubtilines est représentée sur la figure 19. Les analyses sont réalisées selon le protocole décrit au § 2.7.4.2.

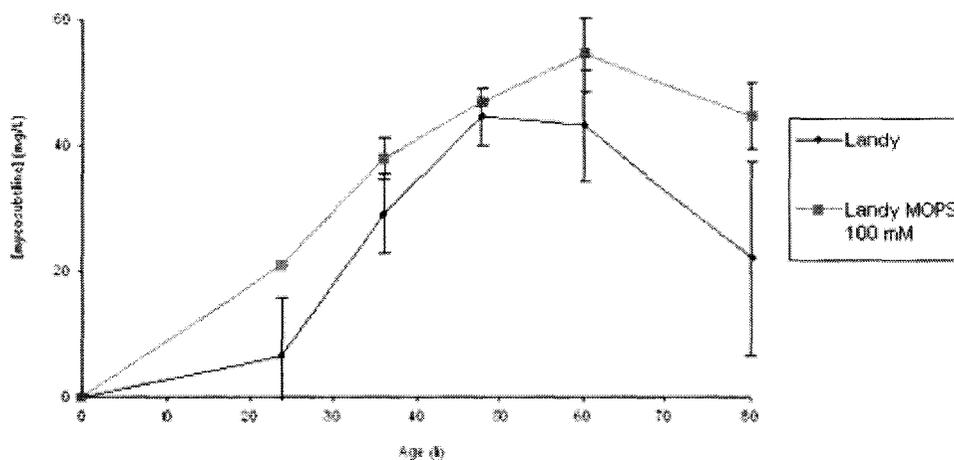


Figure 19 : Cinétique de production des mycosubtilines par *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 7,0 par du MOPS à une concentration de 100 mM.

La production est observée durant les 80 premières heures et atteint un maximum de 55 mg/L à 60 h en présence de MOPS 100 mM. La diminution de la concentration en mycosubtilines après 48 h, plus marquée sur le milieu de Landy non tamponné, doit être analysée avec précaution compte tenu des écart-types importants sur les valeurs mesurées. Cette chute pourrait être due à un problème d'interférence entre le pH de l'échantillon et la méthode de purification des lipopeptides. En effet, le pH atteignant une valeur élevée de 8 pourrait modifier le comportement des lipopeptides lors de leur prépurification sur colonne C18. Cette hypothèse pourrait d'ailleurs expliquer que l'on ne dose aucun lipopeptide sur le milieu DSM lorsque le pH atteint la valeur de 9 (§ 3.2.2.). De plus, une dégradation ou une reconsommation des mycosubtilines pourraient avoir lieu lorsque le pH remonte ou lorsque plus aucune autre source de substrat carboné n'est disponible.

La cinétique de production des isoformes *isoC-16*, *anteisoC-17* et *isoC-17* de mycosubtiline est présentée sur la figure 20.

### 3. Activité biologique et effet des conditions environnementales

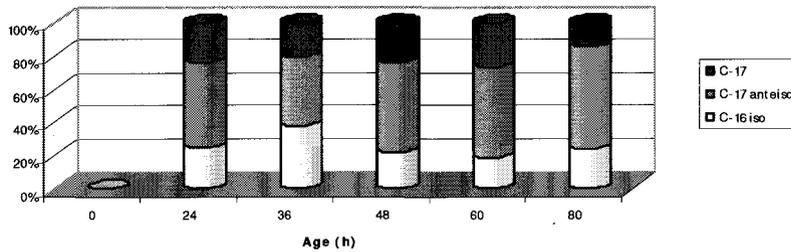


Figure 20 : Evolution des profils des isoformes de mycosubtiline produites par *B. subtilis* ATCC 6633 lors de culture en fioles sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 7,0 par du MOPS à une concentration de 100 mM.

Il n'y a peu d'évolution des proportions relatives des isoformes au cours de la culture. Seules les proportions de mycosubtiline *isoC-16* et *anteisoC-17* augmentent légèrement à 36 h et 80 h de croissance. Le profil moyen est constitué d'environ 20% de mycosubtiline *isoC-16*, de 25% de mycosubtiline *isoC-17* et 55% de mycosubtiline *anteisoC-17*.

La cinétique de production des surfactines est présentée sur la figure 21.

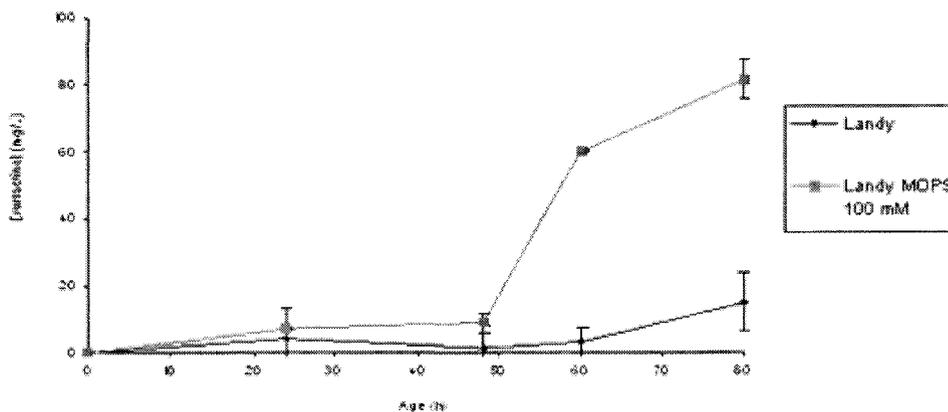


Figure 21 : Cinétique de production des surfactines par *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 7,0 par du MOPS à une concentration de 100 mM.

La production de surfactine atteint un maximum de 82 mg/L à 80 h en présence de MOPS 100 mM. Cette synthèse est découplée de la phase de croissance. Elle démarre en phase stationnaire et est typique d'un produit du métabolisme secondaire ce qui ne correspond pas aux résultats de la littérature. D'après Leenders *et al.*, 1999, la surfactine serait produite par *B. subtilis* ATCC 6633 durant la phase exponentielle de croissance lors d'une culture sur milieu de Landy. La quantité de mycosubtiline produite rapportée à la quantité de surfactine produite est égale à 5,22 à 48 h et à 0,92 à 60 h. Cela indique que la sélectivité de la synthèse entre les deux groupes de lipopeptides de *B. subtilis* ATCC 6633 varie fortement au cours du temps. Dans notre cas, la recherche d'un rapport élevé permettant de favoriser la production de mycosubtiline au détriment de la production de surfactine orientera l'arrêt des cultures après 48 h de croissance, c'est à dire au début de la phase stationnaire.

#### 3.3.1.2. AUTRES TAMPONS

Des cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy pH 7,0 en présence de tampons phosphate 100 et 250 mM ou MOPS 50 et 250 mM n'ont pas permis d'observer une croissance bactérienne suffisante. L'observation au microscope réalisée à partir d'échantillons prélevés sur ces cultures a permis de révéler un agencement des bacilles en pelotes ou flocs ainsi que la présence de spores au centre de ces pelotes. Plusieurs essais de remise en suspension des cellules dans du milieu de Landy frais ont été réalisés afin de tenter de redémarrer la culture. Mais aucune croissance n'a pu être observée dans ces conditions de travail.

#### **3.3.2. CULTURE EN FIOLES SUR MILIEU DE LANDY A DIFFERENT PH**

Une concentration en tampon de 100 mM permet de limiter les variations de pH sans affecter la croissance. L'étude se poursuit en faisant varier le pH initial du milieu de culture tamponné de sorte à faire varier la plage de travail en pH et de mesurer son influence sur la physiologie du microorganisme et la production des mycosubtilines. Les paramètres suivis au cours de ces cultures sont la concentration cellulaire, le pH, la concentration en glucose résiduel, en acide glutamique, en acétate, en lactate et en mycosubtiline. Un deuxième tampon zwitterionique, le MES, est utilisé car le pKa du MOPS d'une valeur de 7,20 à 25°C ne permet pas de tamponner efficacement dans des zones de pH proches de 6. Le pKa du MES à

25°C est de 6,10. Pour pouvoir comparer les résultats entre les expériences avec le MOPS et le MES, une expérience est réalisée entre les tampons au même pH de 6,5. Pour résumer, 4 cultures à différents pH sont lancées en parallèle :

- A pH 7,0 sans tampon (témoin),
- A pH 6,5 en présence d'un tampon MOPS 100 mM,
- A pH 6,5 en présence d'un tampon MES 100 mM,
- A pH 6,0 en présence d'un tampon MES 100 mM.

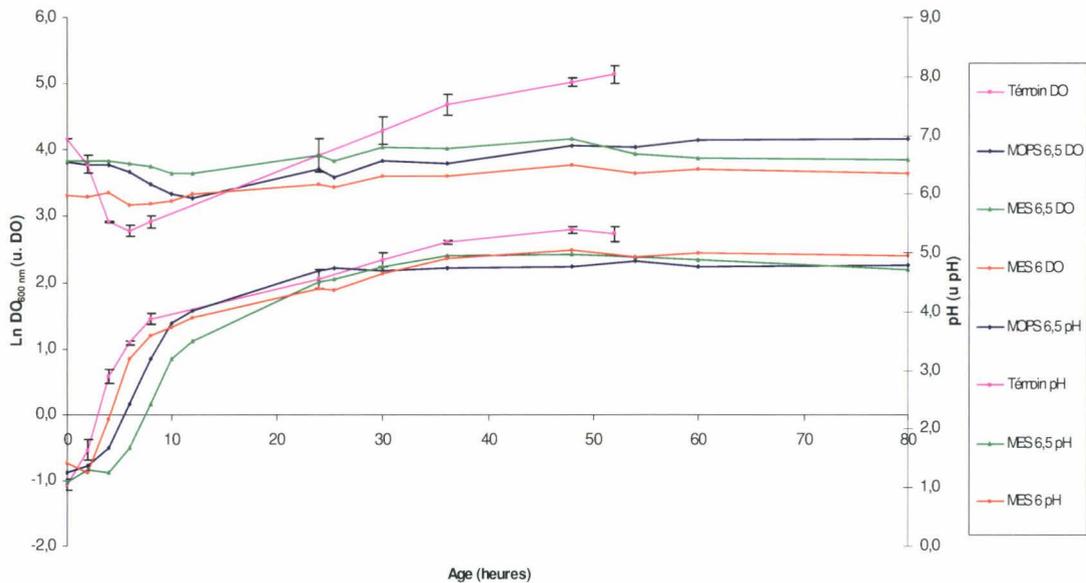


Figure 22 : Evolution du logarithme de la DO à 600 nm et du pH lors de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landynon tamponné ou tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6 par du MES 100 mM.

La figure 22 permet de constater que les courbes de croissance sont comparables. Seuls la phase de latence sur les milieux tamponnés à pH 6,5 est plus longue et la concentration en biomasse en fin de culture sensiblement plus faible. Concernant le pH, il y a moins de variations sur les milieux tamponnés par le MES. Cela peut être dû soit à un meilleur effet tampon, soit à une production plus faible en molécules acidifiantes ou à leur re-consommation plus rapide.

Les figures 23, 24 et 25 représentent les cinétiques de la consommation du glucose et d'apparition de l'acétate et du lactate.

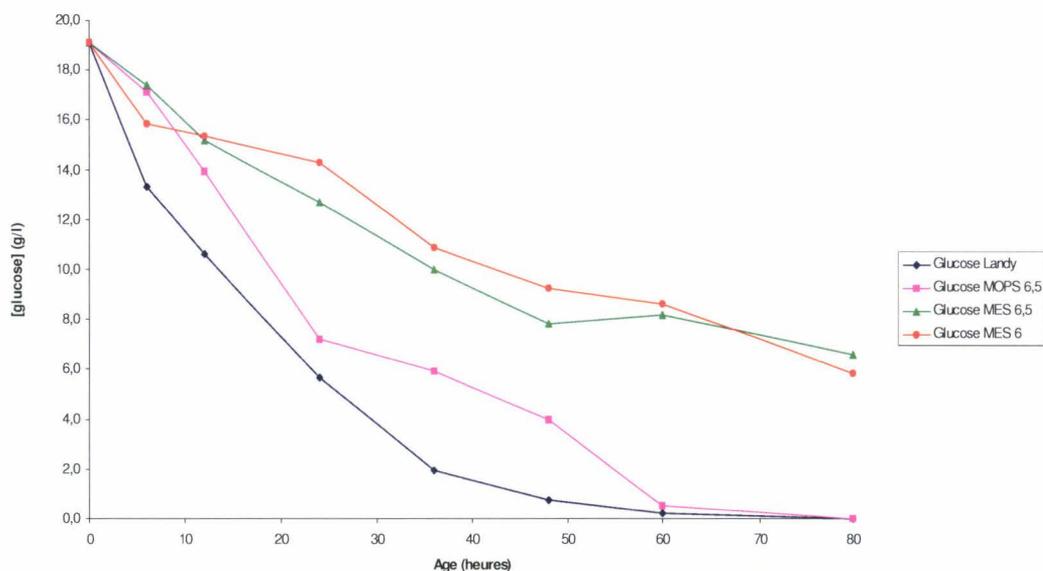


Figure 23 : Evolution de la consommation en glucose lors de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6 par du MES 100 mM.

L'évolution de la concentration en glucose montre qu'en fin de culture il reste une quantité non négligeable dans le cas des milieux tamponnés par le MES. Il est à noter que la vitesse de consommation du glucose dans la condition MOPS pH 6,5 ralentit à partir de 24 h comparativement à la condition témoin en raison d'une entrée en phase stationnaire plus précoce.

La cinétique d'apparition de l'acétate est sensiblement identique dans tous les milieux étudiés, cependant, les maxima de production diffèrent (figure 24).

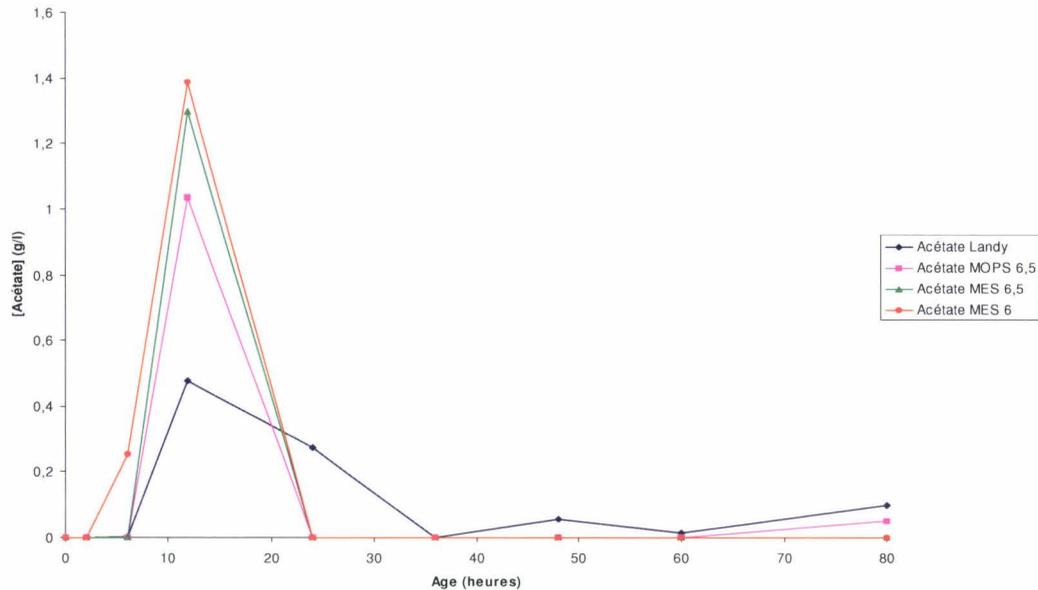


Figure 24 : Evolution de l'apparition de l'acétate lors de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6,0 par du MES 100 mM.

La production la plus importante apparaît dans le milieu tamponné à pH 6,0 par le MES, suivi de près par le milieu tamponné à pH 6,5 par le MES. Ensuite vient le milieu tamponné à pH 6,5 par le MOPS, avec une production plus basse que dans le milieu tamponné par le MES au même pH. En dernier lieu, on retrouve le milieu de Landy, avec une production trois fois plus faible.

La production du lactate semble plus tardive que pour l'acétate puisqu'elle apparaît seulement après 6 h et n'atteint que 0,2 g/L au maximum à 12 h (figure 25). Elle est quasi nulle à pH 6,0. Les milieux tamponnés à pH 6,5 ont des taux de production similaires, cependant les maxima sont atteints à des moments différents. Les taux de production sont deux à trois fois plus faibles que pour le témoin.

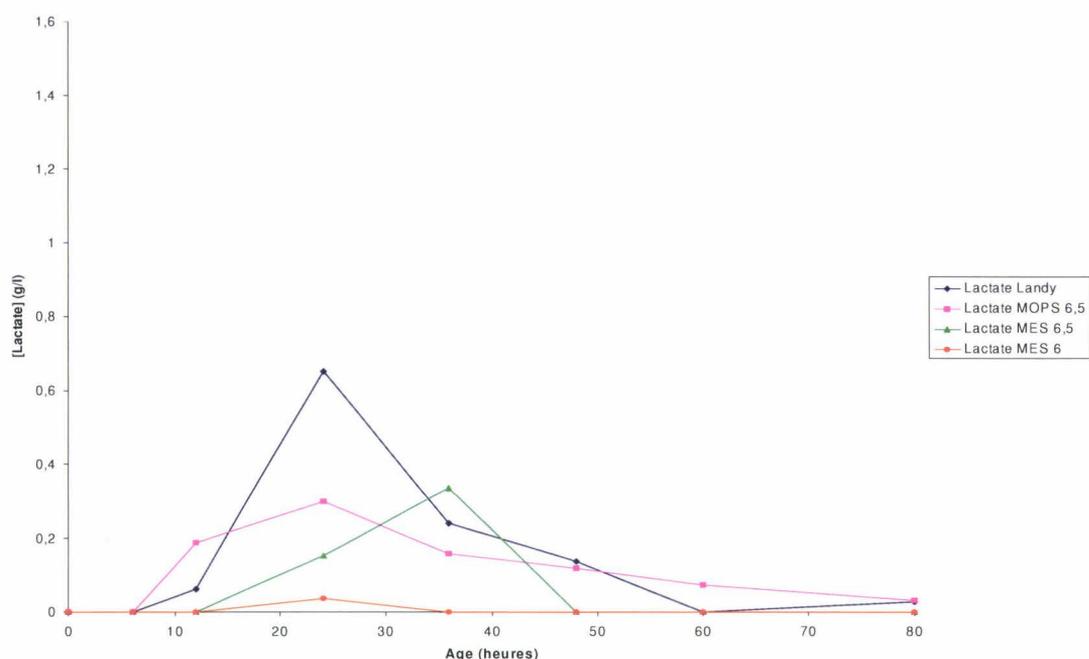


Figure 25 : Evolution de l'apparition du lactate lors de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6 par du MES 100 mM.

Le tableau 14 présente les résultats des dosages de l'acide glutamique.

Tableau 14 : Concentration de l'acide glutamique (g/L) dans le milieu de Landy non tamponné, tamponné à pH 6,5 par du MOPS ou du MES à une concentration de 100 mM ou tamponné à pH 6 par du MES à une concentration de 100 mM lors de cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633.

	Landy	MOPS 6,5	MES 6,5	MES 6
<b>10 h</b>	2,992	3,288	3,847	3,629
<b>30 h</b>	1,438	2,128	1,305	1,590
<b>80 h</b>	0,024	0,163	0,154	0,131

Certaines différences sont observables entre les milieux tamponnés par du MOPS et par du MES. Il semble que la consommation d'acide glutamique soit plus élevée entre 0 et 10 h en présence de MOPS et entre 10 et 80 h en présence de MES. Cependant, il faudrait les

analyses d'un plus grand nombre d'échantillons pour confirmer cette observation. La figure 26a montre les cinétiques de production de mycosubtiline.

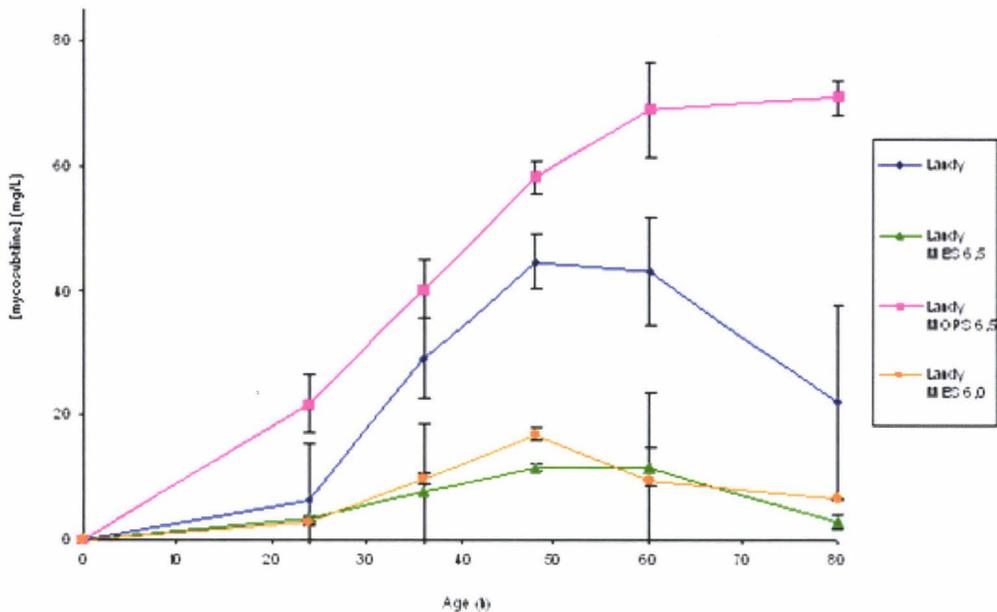


Figure 26a : Cinétique de production de mycosubtiline lors de cultures de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy non tamponné ou tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6 par du MES 100 mM.

La production de mycosubtiline est fortement variable au-delà de 48 h dans le cas de la culture témoin ce qui renforce l'idée de limiter les variations de pH en utilisant un tampon. Elle est meilleure dans le milieu tamponné avec du MOPS à pH 6,5. Elle atteint 69 mg/L et est 5 fois supérieure à celle observée avec le MES au même pH à 60 h. Cette différence importante peut avoir deux origines : l'évolution du pH qui est légèrement différente entre les deux expériences ou un effet direct du MES ou d'un de ses contaminants (OVS) sur le métabolisme cellulaire (Vilarino *et al.*, 1997).

Sur le milieu tamponné par le MOPS, la production se poursuit plus longtemps que sur le milieu de Landy. Aucune chute de la concentration en mycosubtiline n'est observée. L'hypothèse du § 3.3.1.1. expliquant la diminution de la concentration en mycosubtiline par un pH alcalin n'est plus valable dans ce cas. Il s'agit plus probablement d'une

reconsommation de la mycosubtiline comme substrat lorsque toutes les sources de carbone sont consommées. Se basant sur ce résultat et pour la suite du travail, les cultures seront arrêtées 48 h après inoculation. La figure 26b présente les cinétiques de production de surfactine.

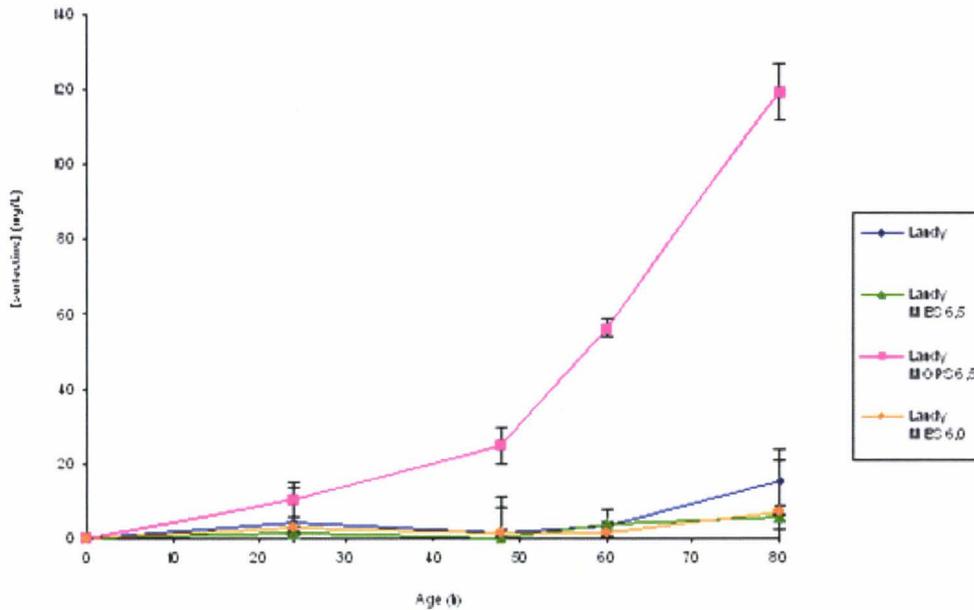


Figure 26b : Cinétique de production de surfactine lors de cultures de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6 par du MES 100 mM. Comparaison avec le témoin sur milieu de Landy non tamponné.

Dans le cas des cultures en présence de MES, une faible production de surfactine est observable dans les 24 premières heures. La concentration chute entre 24 et 48 h puis augmente légèrement entre 48 et 80 h. Il apparaît que la culture en présence de MOPS 100 mM pH 6,5 favorise la synthèse de surfactine puisque 119 mg/L sont obtenus après 80 h de culture, soit huit fois plus que sur milieu de Landy non tamponné. La quantité de mycosubtiline produite rapportée à la quantité de surfactine produite est égale à 2,32 à 48 h et à 1,23 à 60 h. Lors des cultures de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy en présence de MOPS 100 mM pH 7.0 (§ 3.3.1.1.), ce rapport était de 5,22 à 48 h et de 0,92 à 60 h.

3. Activité biologique et effet des conditions environnementales

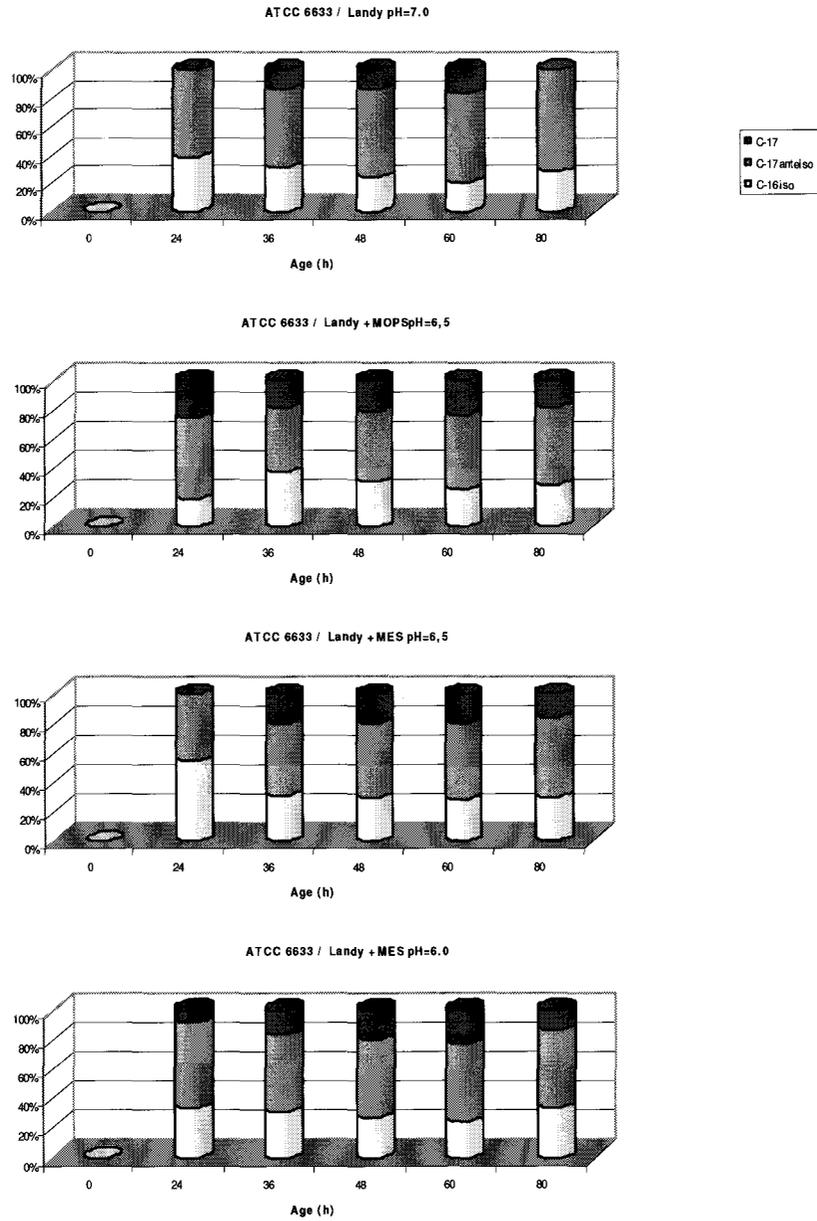


Figure 27 : Evolution des profils des isoformes de mycosubtiline produites par *B. subtilis* ATCC 6633 lors de cultures sur milieu de Landy tamponné à pH 6,5 par du MOPS 100 mM, à pH 6,5 par du MES 100 mM et à pH 6 par du MES 100 mM. Comparaison avec le témoin sur milieu de Landy non tamponné.

La figure 27 représente l'évolution des proportions des isoformes de mycosubtiline au cours du temps pour les différentes expériences. On ne relève pas de différence notable entre les profils dans les milieux témoins ou tamponnés par le MOPS et le MES. Le profil moyen se constitue d'environ 20% de mycosubtiline *isoC-16*, de 25% de mycosubtiline *isoC-17* et 55% de mycosubtiline *anteisoC-17*. L'aspect cinétique de la synthèse ne relève pas d'évolution notable du profil au cours du temps sauf pour les expériences témoin et MES pH 6.5 où aucune mycosubtiline C-17 n'est détectable à 24 h. Ce résultat est probablement lié aux très faibles concentrations en mycosubtiline détectées à 24 h.

### 3.3.3. EN BREF

L'analyse physiologique rend compte globalement de la complexité des réactions engagées lors de la croissance exponentielle puis linéaire de ATCC 6633. Une modulation de la vitesse de consommation de la source carbonée principale, le glucose, et de la source azotée principale, l'acide glutamique, a été observée. Ce phénomène combiné à l'utilisation probable de l'acide glutamique comme source de carbone secondaire expliquerait cette croissance atypique. Celle-ci s'accompagne dans un premier temps d'une chute du pH avec apparition des acides organiques, l'acétate puis le lactate, et dans un deuxième temps d'une augmentation du pH dû à la reconsumption de ces derniers.

Quoi qu'il en soit, au vu des résultats sur l'étude de l'influence du pH sur la production de mycosubtiline, il est proposé de tamponner le milieu de Landy par du MOPS 100 mM à pH 7,0 et d'arrêter les cultures après 48 h de croissance, *i.e.* en début de phase stationnaire. Cette condition permet de limiter les variations de pH entre 6,2 et 7,3 ce qui autorise une croissance du *Bacillus* dans une zone de pH centrée sur la zone optimale de croissance comprise entre  $6,5 < \text{pH} < 7,0$ . Elle permet de combiner les objectifs de productivité et de sélectivité de la réaction menant à la synthèse de mycosubtiline. En effet, une production de 55 mg/L en mycosubtiline est obtenue et le rapport de la quantité de mycosubtiline sur surfactine est supérieur à 5. Enfin, l'arrêt des cultures à 48 h permet d'éviter l'éventuelle reconsumption du produit par la souche.

### 3.4. INFLUENCE DES SOURCES AMINEES SUR LA NATURE DE LA CHAÎNE LIPIDIQUE DES MYCOSUBTILINES

#### 3.4.1. INFLUENCE CHEZ *B. SUBTILIS* ATCC 6633 ET BBG100

La composition du milieu de culture et notamment celle en acides aminés influence la production de lipopeptides en modifiant la proportion des différents homologues ou isoformes de lipopeptides synthétisés (Chevanet *et al.*, 1986) (Besson et Hourdou, 1987) (Hourdou *et al.*, 1989) (Besson *et al.*, 1992). Dans la littérature, les acides aminés les plus influents sur la production de lipopeptides sont l'acide glutamique, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine et la thréonine. Ils ont donc été testés afin de mesurer leur influence sur la formation sélective d'isoformes de mycosubtiline par ATCC 6633 et son dérivé BBG100. Ils sont ajoutés à une concentration de 2 g/L (Besson *et al.*, 1992) à un milieu de Landy modifié, où l'acide glutamique est remplacée par du sulfate d'ammonium à 2,3 g/L, voir § 2.2.1.5. L'ajout d'acide palmitique a aussi été testé.

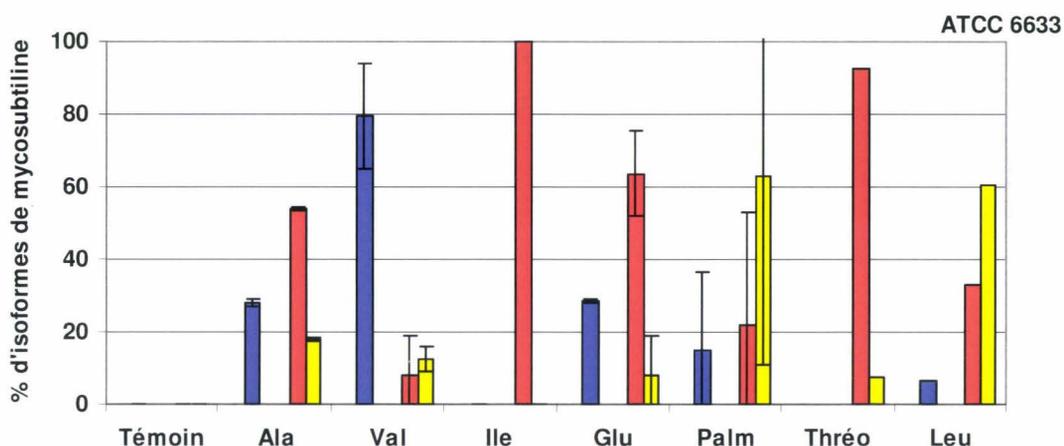


Figure 28 : Proportions des diverses isoformes présumées de mycosubtiline (en bleu foncé : isoC-16 ; en rouge : anteisoC-17 ; en jaune : isoC-17) après 48 h de culture de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy modifié MOPS 100 mM pH 7,0 additionné d'alanine, de valine, d'isoleucine, d'acide glutamique, d'acide palmitique, de thréonine ou de leucine. Les cultures sont réalisées en duplicat sauf dans les conditions leucine et thréonine.

La figure 28 montre les proportions des divers homologues et isoformes présumés de mycosubtiline dosés par CLHP et produits par la souche *B. subtilis* ATCC 6633 pour les différents acides aminés testés. Aucune production n'a pu être observée pour le témoin de culture. En présence d'acide glutamique à 2 g/L, le profil obtenu est proche du profil moyen obtenu sur milieu de Landy (acide glutamique à 5 g/L) et décrit au § 3.3.2. Le même profil est obtenu en présence d'alanine. En présence d'isoleucine ou de thréonine, de valine et de leucine, la formation d'un pic fortement majoritaire est à chaque fois observée. Les résultats de CLHP ont été complétés par une analyse en spectrométrie de masse, voir § 2.7.4.4. pour les conditions de culture additionnées de valine et d'isoleucine (figures 29 et 30).

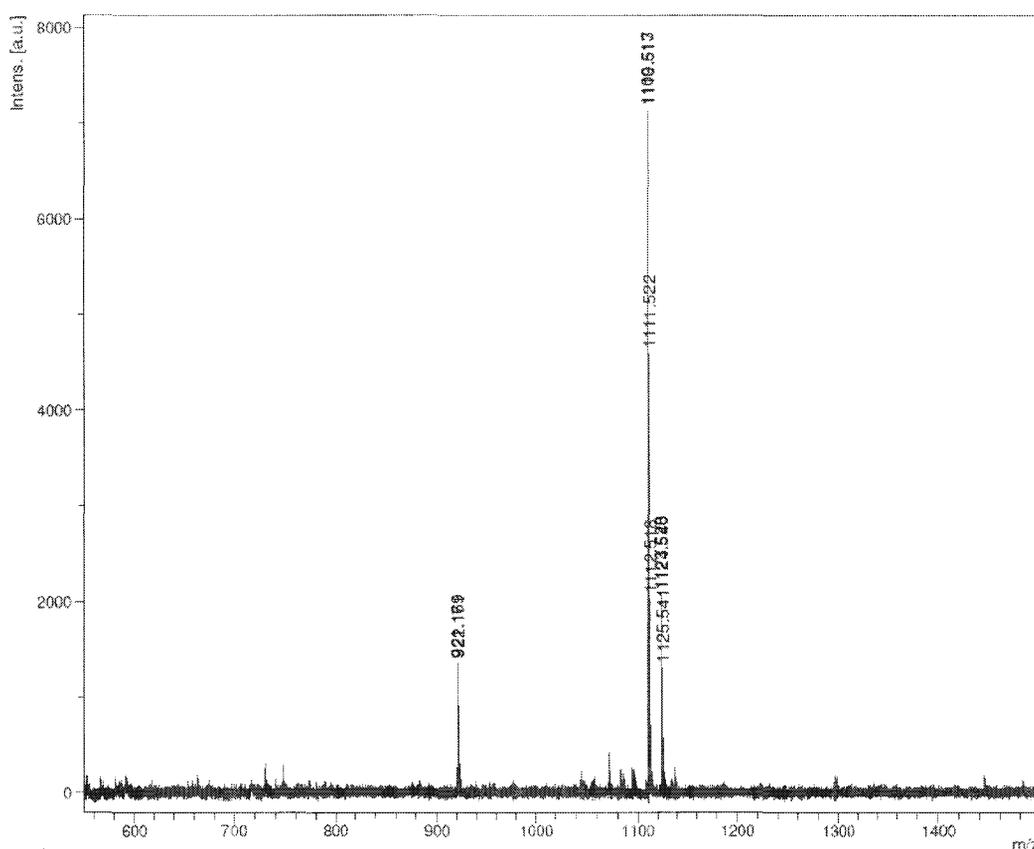


Figure 29 : Spectre de masse MALDI-TOF provenant d'un surnageant pré-purifié sur colonne C18 d'une culture de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy modifié MOPS 100 mM pH 7,0 additionné de valine.

Le rapport du pic principal  $m/z$  de 1109,513 est à rapprocher de la valeur théorique du rapport pour la mycosubtiline C-16  $[M+K^+]$  qui est de 1109,539.

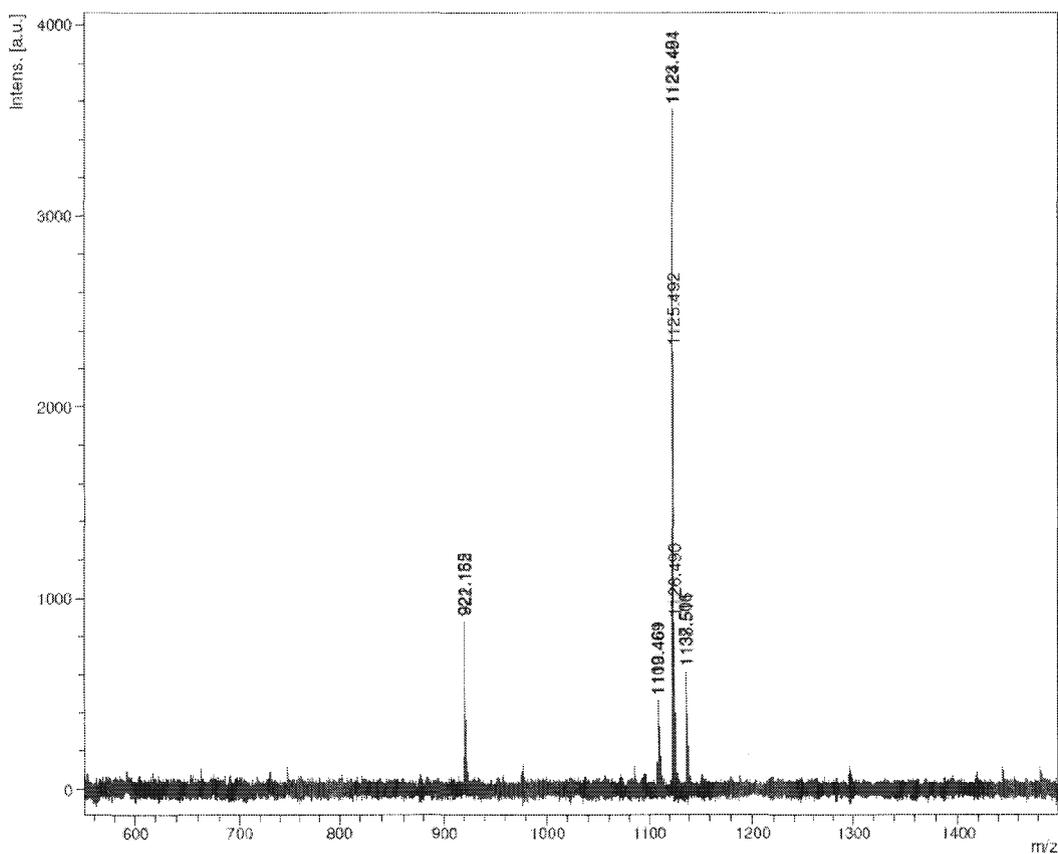


Figure 30 : Spectre de masse MALDI-TOF provenant d'un surnageant pré-purifié sur colonne C18 d'une culture de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy modifié MOPS 100 mM pH 7,0 additionné d'isoleucine.

Le rapport  $m/z$  de 1123,484 est à rapprocher de la valeur théorique du rapport pour la mycosubtiline C-17  $[M+K^+]$  qui est de 1123,554.

La figure 29 montre qu'en présence de valine, il y a orientation de la production vers une isoforme de type C-16. Le résultat de la figure 30 montre que lorsque le milieu de culture contient de l'isoleucine ou de la thréonine, une isoforme à longue chaîne lipidique C-17 est produite majoritairement.

Ces résultats permettent d'identifier les différents pics de mycosubtiline sur la base de travaux réalisés par Kaneda présentés dans le § 1.5.2 et largement résumés dans une revue en 1991. Ces travaux montrent que chez *B. subtilis*, l'isobutyryl-CoA, l'isovaléryl-CoA et le méthyl-2-butyryl-CoA proviennent soit de la synthèse *de novo* d'acides gras branchés, soit de l'apport exogène respectif de la valine, de la leucine ou d'isoleucine. Ces intermédiaires métaboliques sont les précurseurs respectifs des acides gras *iso*C-14 ou C16, *iso*C-15 ou C-17 et *anteiso*C-15 ou C-17. Plus récemment, des auteurs ont étudié les proportions d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés incorporés dans un composé lipopeptidique X (proche de la surfactine) (Besson *et al.*, 1992) en fonction de différentes conditions d'ajout d'acides aminés branchés. Ces auteurs ont montré que chez ATCC 6633, la présence de valine permettait d'augmenter la proportion d'acide gras  $\beta$ -hydroxylés *iso* pairs, la présence d'isoleucine celle d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés *anteiso* impairs (particulièrement l'homologue C-15) et la présence de leucine celle d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés *iso* impairs.

Comparées à nos résultats, ces informations nous permettent de conclure que la présence de valine favorise la formation de mycosubtiline *iso*C-16, la présence d'isoleucine celle de mycosubtiline *anteiso*C-17 et la présence de leucine celle de mycosubtiline *iso*C-17.

La disponibilité en précurseurs d'acide gras étant impliquée dans la sélectivité de la synthèse d'isoformes de mycosubtiline un schéma métabolique de synthèse est proposé dans la figure 31. Il est à noter que la thréonine étant un précurseur de l'isoleucine (Sonenshein *et al.*, 2001), cela explique que les profils obtenus en présence de ces deux acides aminés soient similaires.

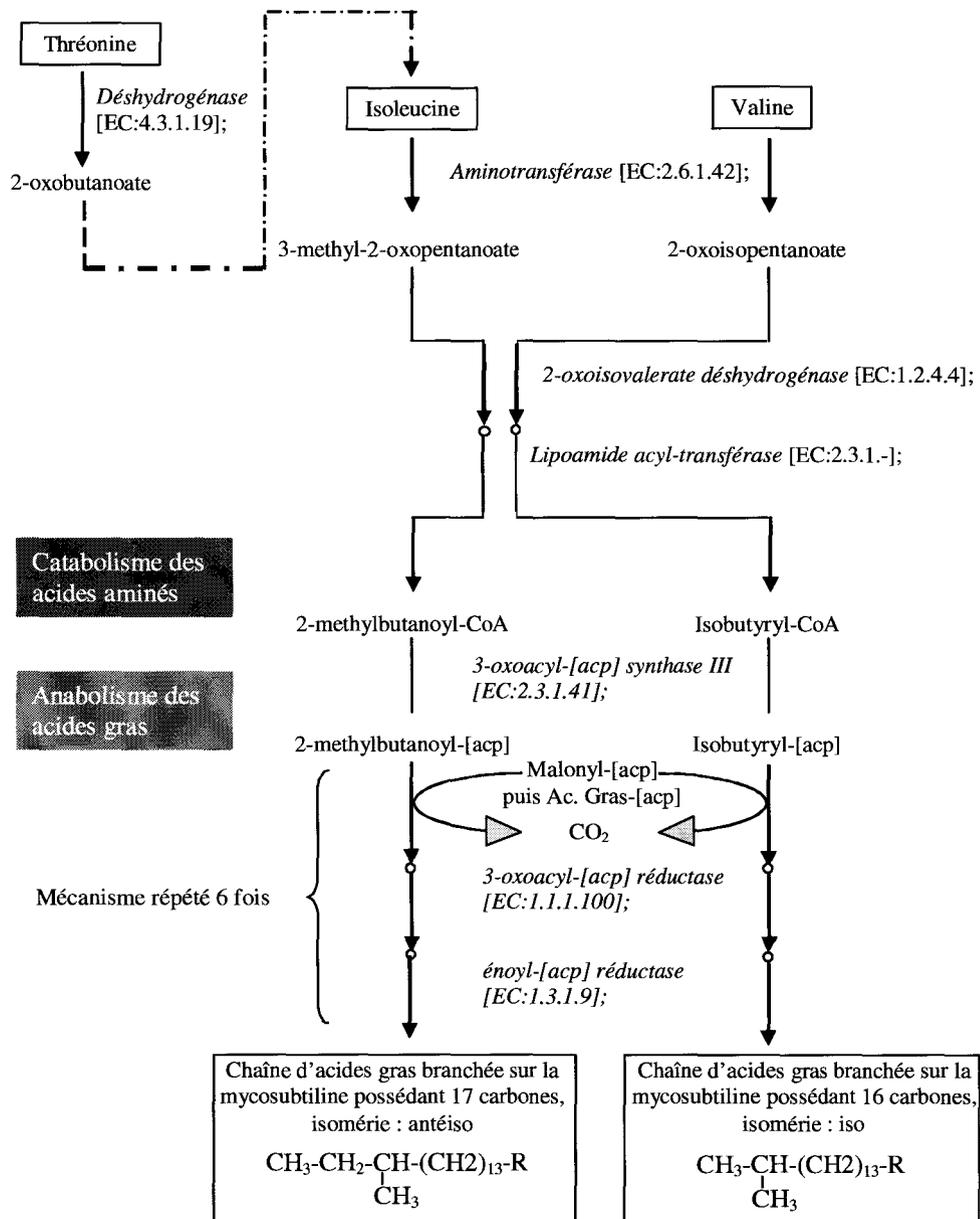


Figure 31 : Métabolisme candidat de la synthèse de mycosubtiline isoC-16 et anteisoC-17 chez *B. subtilis* (modifié de Kegg)

La figure 32 représente les proportions des diverses isoformes de mycosubtiline produites par la souche recombinante *B. subtilis* BBG100 dans différentes conditions d'ajout d'acides aminés.

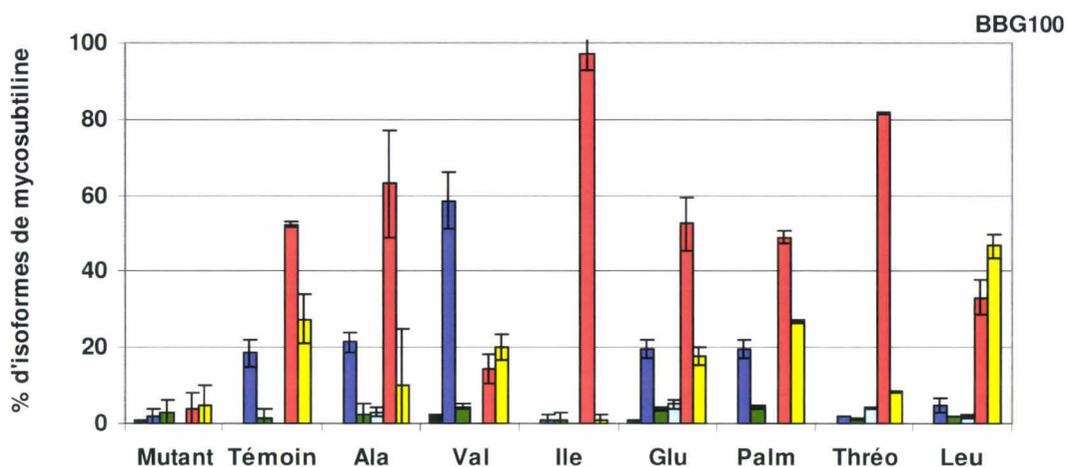


Figure 32 : Proportions des diverses isoformes de mycosubtiline (en bleu foncé : isoC-16 ; en vert : C-16 ; en bleu clair : C-16 ; en rouge : anteisoC-17 ; en jaune : isoC-17) après 48 h de culture de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié MOPS 100 mM pH 7,0 additionné d'alanine, de valine, d'isoleucine, d'acide glutamique, d'acide palmitique, de thréonine et de leucine. Les cultures sont réalisées en duplicats.

Comme précisé dans la section matériels et méthodes, la souche BBG100 a été obtenue dans un précédent travail (Leclère *et al.*, 2005) par remplacement du promoteur  $P_{myc}$  de l'opéron *myc* codant pour la mycosubtiline synthétase par un promoteur fort constitutif  $P_{repU}$  originaire du plasmide pUB110 de *Staphylococcus aureus*. Cette souche est surproductrice de mycosubtiline synthétase. Par rapport aux cultures de *B. subtilis* ATCC 6633, les analyses en CLHP révèlent la présence de deux homologues supplémentaires (en vert et bleu clair sur la figure 32). Etant en quantité faibles, ils ne sont pas caractérisables facilement. Nous pensons qu'il s'agit de deux isoformes de mycosubtiline C-16. Il est intéressant de remarquer que globalement les profils des isoformes de mycosubtiline sont comparables entre les deux souches. La différence majeure se retrouve pour la condition témoin puisque BBG100 produit les trois principales isoformes

(*isoC-16*, *anteisoC-17*, *iso C-17*) de mycosubtiline et non ATCC 6633. En présence d'acide palmitique, les isoformes *anteisoC-17* et *isoC-17* ne sont pas dans les mêmes proportions mais la déviation standard est très élevée pour cette expérience. Ceci est dû aux interférences analytiques générées par l'acide palmitique qui interagit probablement avec la matrice C-18 de la colonne de séparation. De plus, le problème de la solubilité de l'acide palmitique dans le milieu de Landy modifié entraîne des difficultés dans la réalisation des expériences et de leur suivi. Il n'existe pas de différence entre la condition témoin et celles en présence d'acide glutamique et d'alanine. Comme dans le cas de *B. subtilis* ATCC 6633 en présence de valine, la production est orientée vers l'isoforme de type *isoC-16*. De la même façon, en présence d'isoleucine ou de thréonine, l'isoforme *anteisoC-17* est produite majoritairement. En présence de leucine, la production de l'isoforme de type *isoC-17* est favorisée.

#### **3.4.2. EN BREF**

L'étude de l'effet des acides aminés sur la production de mycosubtiline par *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 montre qu'en présence de valine, d'isoleucine et de leucine, la production est orientée respectivement vers l'isoforme de type *isoC-16*, *anteisoC-17* et *isoC-17*. Ces conditions expérimentales permettant l'obtention de différentes sélectivités de la synthèse de mycosubtiline serviront de base par la suite à l'étude comparative en transcriptomique dont l'objectif principal sera de mettre en évidence les mécanismes permettant la synthèse de mycosubtiline *anteisoC-17*.

### 3.5. PRODUCTIVITE EN MYCOSUBTILINE ET SOURCES CARBONEES

Des auteurs ont réalisé une étude sur l'influence de la source carbonée en testant la capacité de synthèse d'iturines par *B. subtilis* NCIB 8872 en présence de glucose, de glycérol, d'acide lactique, d'acide pyruvique et d'acide citrique (Besson *et al.*, 1987). L'utilisation des acides organiques a conduit à une quasi-absence de synthèse d'iturine. Ce phénomène serait lié aux valeurs extrêmes de pH atteintes lors des ces cultures non tamponnées. En revanche, une forte synthèse d'iturine a été observée en présence de glycérol. L'utilisation du glycérol doit permettre de limiter la production d'acides organiques et aussi la répression catabolique exercée dans certains cas par le substrat. Nous avons donc testé cette source carbonée lors d'expériences où le glucose est remplacé de façon équimolaire par du glycérol. Dans cette étude, l'objectif est de déterminer si l'utilisation du glycérol permettait d'atteindre au moins la productivité en mycosubtiline obtenue en présence de glucose. Les cultures ont été réalisées avec la souche *B. subtilis* BBG100 dans le milieu de Landy modifié tamponné par du MOPS 100 mM à pH 7,0.

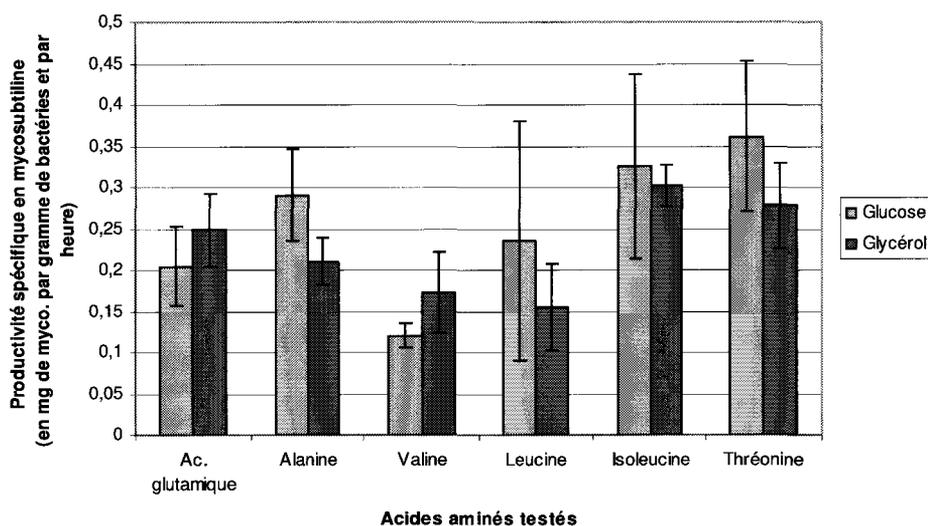


Figure 33 : Productivités spécifiques en mycosubtiline produite par *B. subtilis* BBG100 après 72 h de culture sous différentes conditions (variation des sources carbonées : glucose et glycérol, et des sources aminées : acide glutamique, alanine, valine, leucine, isoleucine et thréonine). Les cultures sont réalisées en duplicat.

La comparaison de la valeur moyenne des productivités spécifiques en mycosubtiline pour chaque série d'acide aminé testée montre que le remplacement par du glycérol ne permet pas d'atteindre des valeurs plus élevées (figure 33). Les écarts-types mesurés sur la productivité spécifique sont importants et se recouvrent au sein de chaque série rendant l'interprétation difficile. Le glucose permettrait cependant l'obtention de productivité spécifique moyenne sensiblement plus élevée. Les résultats obtenus en présence de glycérol pourraient par exemple être exploités dans un procédé de production en bioréacteur alimenté en continu, où les concentrations en source carbonée peuvent être élevées, sans provoquer de répression catabolique chez *Bacillus*. Aucun effet sur la sélectivité du profil de biosynthèse des isoformes de mycosubtilines n'a été observée entre les cultures réalisées en présence de glucose et celles en présence de glycérol.

### **3.6. INFLUENCE DU FER SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR *B. SUBTILIS* ATCC 6633 ET BBG100**

#### **3.6.1. INTRODUCTION**

Si l'on se réfère au § 3.3.1.1., la croissance montre un ralentissement entre 4 et 8 h qui se traduit par un ralentissement de l'acidification et qui se prolonge ensuite lors de la phase d'alcalinisation. Cette croissance ralentie pourrait être liée à une limitation par un des substrats, notamment une carence en fer. De plus, selon certains auteurs, l'ajout de fer dans le milieu de culture non tamponné peut entraîner une augmentation de la production en surfactine par *B. subtilis* ATCC 21332 (Wei et Chu, 1998). Un effet semblable pourrait être observé sur la production de mycosubtiline par *B. subtilis* ATCC 6633.

#### **3.6.2. EFFET D'UN AJOUT**

Des cultures de *B. subtilis* ATCC 6633 en milieu de Landy supplémenté en fer ont été réalisées. Les concentrations testées sont 6, 60 et 600  $\mu\text{M}$ . Les cinétiques d'évolution de la croissance et du pH d'ATCC 6633 sont données dans la figure 34.

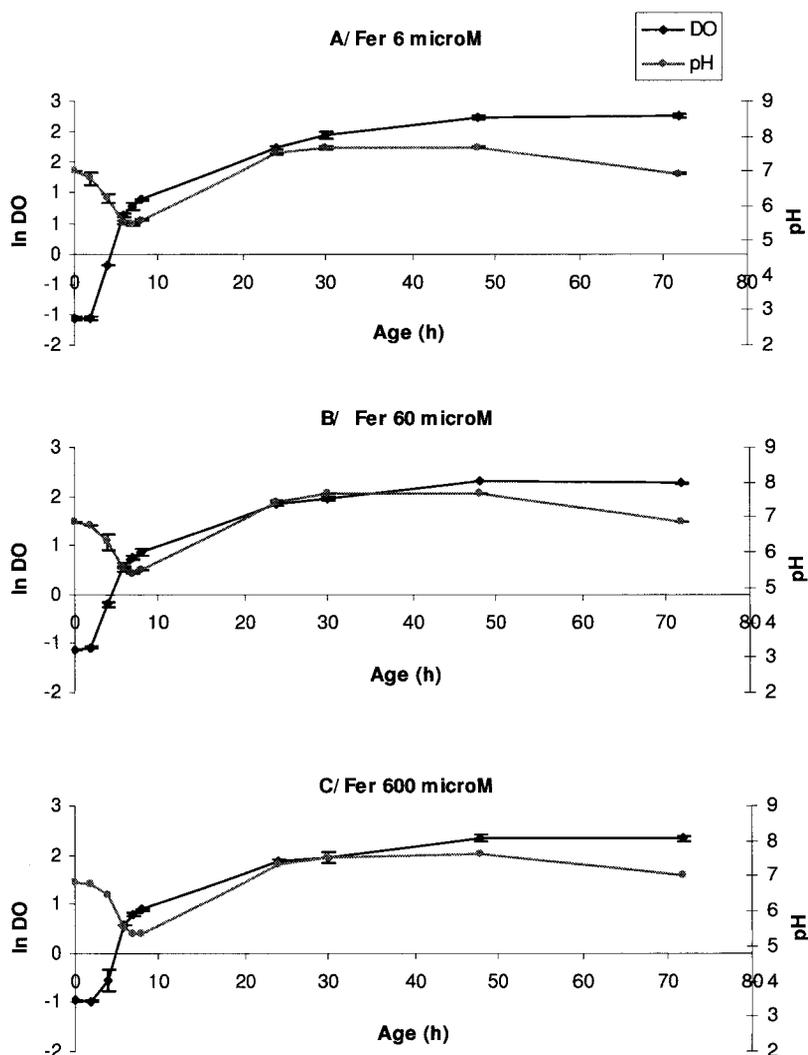


Figure 20 : Evolution de la DO et du pH en fonction du temps pour des cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 avec différente concentration en fer : A : 6  $\mu$ M, B : 60  $\mu$ M, C : 600  $\mu$ M

Les courbes d'évolution de la DO et du pH obtenues avec ATCC 6633 sont similaires entre-elles. Les cinétiques de croissance montrent dans tous les cas un ralentissement de la croissance comme évoqué au § 3.3.1.1. Dans l'hypothèse où ce ralentissement est dû à une limitation par un des composés du milieu de culture, il ne semble donc pas que le fer soit en cause. Le fer ne semble donc pas être limitant. Concernant le pH, les courbes correspondant

aux ajouts de 6, 60 et 600  $\mu\text{M}$  en fer sont comparables entre elles et sont similaires au témoin du § 3.3.1.1. durant les 48 premières heures. Une légère acidification inexplicée apparaît entre 48 et 72 h.

Les productions de mycosubtiline sont données pour la souche BBG100 dans le tableau 15.

Tableau 15 : Concentrations en mycosubtiline pour les cultures avec ajout de fer.

Concentration en fer ( $\mu\text{M}$ )	mycosubtiline (mg/L)
6	139
60	143
600	75

Une production similaire en mycosubtiline est observée dans le cas d'ajout de 6 et 60  $\mu\text{M}$  de fer. En revanche, l'augmentation de la concentration en fer au-delà de 60  $\mu\text{M}$  s'accompagne d'une diminution de la production. Dans ces conditions, la concentration en fer devient inhibitrice de la synthèse de mycosubtiline.

### 3.6.3. EN BREF

Le ralentissement de la croissance ne semble pas être dû à une limitation par le fer. Un ajout de fer n'aide pas non plus à augmenter la production de mycosubtiline.

### **3.7. EFFET DU TRANSFERT D'OXYGENE SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE DANS UN SYSTEME DE CULTURE AEREE EN SURFACE RAMOS**

#### **3.7.1. INTRODUCTION**

Le ralentissement de la croissance observé au § 3.2.1.1. entre quatre et 8 h de culture pourrait être lié à une limitation par l'oxygène. Cette étude comporte un double intérêt car le métabolisme de l'oxygène peut influencer la voie non ribosomale de synthèse des lipopeptides microbiens (Desai et Banat, 1997) (Jacques *et al.*, 1999). L'influence de l'aération sur la production de surfactine (Sen et Swaminathan, 1997) a en effet été montrée sur des cultures : plus les conditions de transfert sont importantes, plus la production en surfactine est élevée. Le taux de transfert en oxygène (OTR) est un paramètre essentiel pour quantifier l'effet de différentes conditions de tension en oxygène sur l'état métabolique et physiologique des microorganismes en culture. Jusqu'à présent, aucune étude n'a permis le suivi en ligne du taux de transfert en oxygène à l'aide d'un outil d'analyse des gaz comme un détecteur paramagnétique ou un spectromètre de masse. En effet, que ce soit en fiole d'Erlenmeyer ou en bioréacteur, l'analyse des gaz est prohibée car dans le premier cas elle n'est pas adaptée au système et dans l'autre, elle est confrontée aux débordements de mousse qui accompagnent la synthèse des lipopeptides surfactifs. Ce verrou technologique a pu être levé grâce à l'utilisation d'un système de culture aéré en surface de type RAMOS et dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Department of Biochemical Engineering à Aix-la-Chapelle en Allemagne. Aucun ajout d'agents anti-mousse n'a été effectué pour éviter d'introduire toute interférence métabolique.

L'étude de l'effet d'une limitation en oxygène est entreprise avec un double objectif. Premièrement, suite aux interrogations sur l'origine du ralentissement précoce de la croissance de nos souches sur milieu de Landy, nous avons calculé les paramètres de la culture influant sur le transfert d'oxygène pour que les conditions de culture en fioles à ProBioGEM soient identiques à celles du système RAMOS à Aix-la-Chapelle, et ce afin d'établir si ce phénomène de ralentissement a pour origine une limitation en oxygène. Deuxièmement, il paraît intéressant de caractériser la production de mycosubtiline en faisant varier les niveaux de limitation en oxygène d'une expérience à l'autre.

### 3.7.2. TRANSFERT DES CONDITIONS DE CULTURE DU SYSTEME DE CULTURE EN FIOLES D'ERLENMEYER AUX FIOLES RAMOS

Le transfert des paramètres du système de culture en fioles d'Erlenmeyer (fiole) aux fioles RAMOS (RAMOS) a été réalisé à puissance volumique égale, soit :

$$\frac{P}{V_L} \text{ fiole} = \frac{P}{V_L} \text{ RAMOS}$$

où  $\frac{P}{V_L}$  correspond à la puissance volumique et est calculée selon l'équation :

$$\frac{P}{V_L} = \frac{\rho * n^3 * d^4}{V_L^{2/3} * (70 \text{Re}^{-1} + 25 \text{Re}^{-0.6} + 1,5 \text{Re}^{-0.2})} \quad (\text{Maier et Büchs, 2001})$$

Avec  $n$  : la fréquence d'agitation en  $\text{t.s}^{-1}$ ,  $d$  le diamètre de la base des fioles,  $\text{Re}$  : le nombre de

Reynolds calculé selon la relation :  $\text{Re} = \frac{n * d_0^2 * \rho}{\eta}$

La valeur cible de la puissance volumique est obtenue en minimisant l'erreur correspondant à la différence entre  $\frac{P}{V_L} \text{ fiole}$  et  $\frac{P}{V_L} \text{ RAMOS}$  en utilisant l'algorithme de Newton et en prenant comme variable  $n$  : la fréquence d'agitation.

Les données nécessaires au calcul de  $\frac{P}{V_L} \text{ fiole}$  et  $\frac{P}{V_L} \text{ RAMOS}$  et les valeurs du nombre de Reynolds et de la puissance volumique influencés par la variable  $n$  sont résumés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Données nécessaires au transfert des conditions de culture en fioles d'Erlenmeyer au système de fioles RAMOS

	Cultures en fioles d'Erlenmeyer	Cultures en fioles RAMOS
$\rho$ (kg.m <sup>-3</sup> )	1000	1000
$d^0$ (m)	0,105	0,085
$V_L$ (m <sup>3</sup> )	$5.10^{-5}$	<b><math>2,5.10^{-5}</math></b>
$d_0$ (m)	0,05	0,05
$\eta$ (kg.m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	$1.10^{-3}$	$1.10^{-3}$
$N$ (rpm) = variable	140	<b>155</b>
Re	25 725	18 532
$\frac{P}{V_L}$	291	291

Pour reproduire les conditions de culture en fioles au laboratoire ProBioGEM au niveau du système RAMOS à Aix-la-Chapelle, l'agitation doit être réglée à 155 rpm pour un volume de liquide de 25 mL.

### **3.7.3. MISE EN EVIDENCE D'UNE LIMITATION EN OXYGENE**

#### **3.7.3.1. SUR MILIEU DE LANDY MODIFIE ADDITIONNE D'ACIDE GLUTAMIQUE**

*B. subtilis* BBG100 est mis en culture dans des fioles RAMOS, voir § 2.6.4.2. contenant du milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique 2 g/L et de MOPS 100 mM pH 7.0. Les évolutions du taux de transfert d'oxygène (OTR en mol/L/h), de dioxyde de carbone (CTR en mol/L/h) et du quotient respiratoire (rapport entre CTR et OTR) sont représentées sur la figure 34. Elles peuvent être analysées en deux parties.

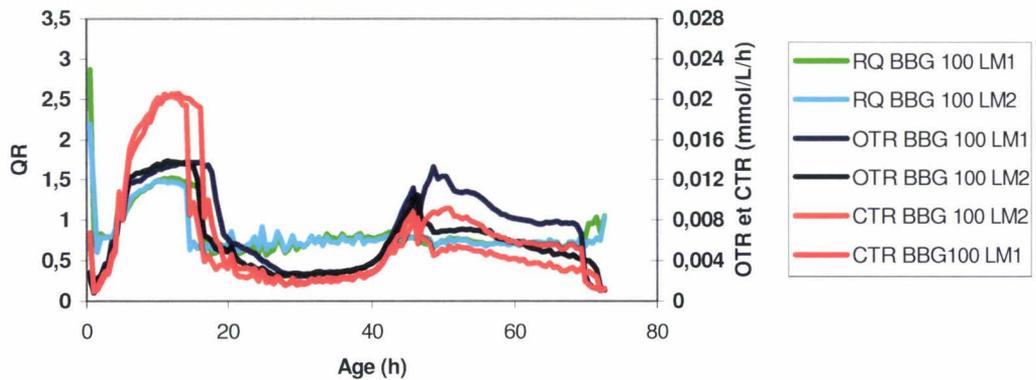


Figure 34 : Evolution du taux de transfert d'oxygène (OTR en mmol/L/h), de dioxyde de carbone (CTR en mol/L/h) et du quotient respiratoire lors de cultures en fioles RAMOS de la souche *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné de 2 g/L d'acide glutamique et de MOPS 100 mM pH 7.0.

- Analyse des gaz entre 0 et 20 h de culture.

Une croissance sur glucose et acide glutamique est observée de 0 à 20 h. La consommation en O<sub>2</sub> et le dégagement du CO<sub>2</sub> augmentent (OTR et CTR respectivement), ces phénomènes étant bien évidemment induits par la multiplication des microorganismes dans le milieu (figure 36). Cependant, après environ 5 h, le taux de transfert en oxygène arrive à son maximum et un plateau à 0,014 mol d'O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> est observé. Ceci indique une limitation en oxygène. Cette limitation pourrait être à l'origine de la production d'acides organiques (figure 35) tels que l'acide acétique ou l'acide lactique (et l'acide oxalique trouvée à l'état de trace).

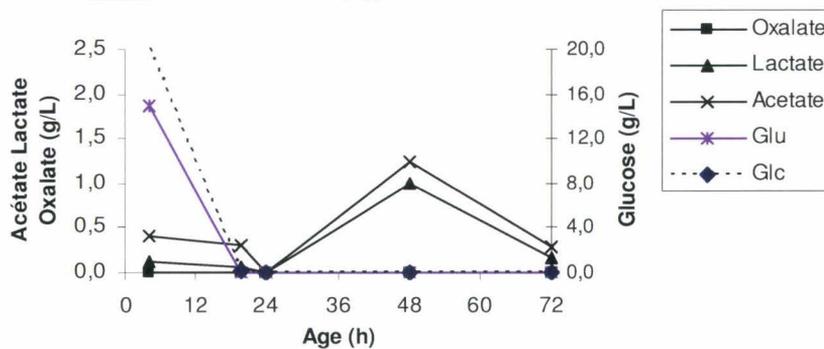


Figure 35 : Evolution des concentrations (g/L) en glucose (Glc), acide glutamique (Glu), acide oxalique, acide lactique et acide acétique lors de cultures en fioles RAMOS de la souche *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L

Il est à noter que l'acétoïne ou le 2,3 butanediol (non dosés mais suspectés) généralement synthétisés par les souches de *B. subtilis* en conditions anaérobies pourraient avoir été produits lors de nos expériences.

- Analyse des gaz après 20 h de culture.

Après 20 h de culture, la totalité des sources carbonées est consommée ce qui explique qu'il n'y ait par la suite plus de production de biomasse (figure 36) et qu'il y ait une diminution du taux de transfert en oxygène et consécutivement une modification de la valeur de QR (figure 34) qui se stabilise aux environs de 0.7-0.8.

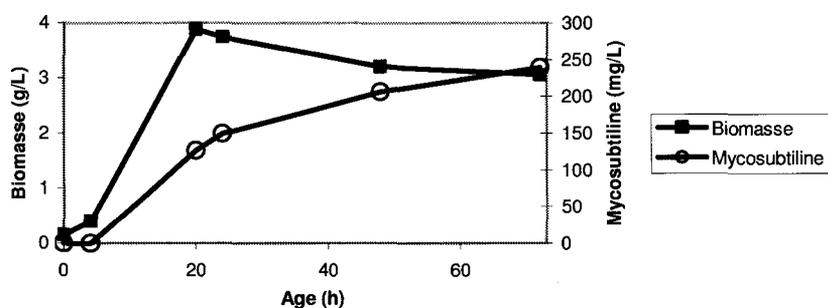


Figure 36 : Evolution de la concentration cellulaire (g/L) et de la production en mycosubtiline (mg/L) lors de cultures en fioles RAMOS de la souche *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L et de MOPS 100 mM pH 7.0.

Pendant, une activité métabolique résiduelle est observée. Il subsiste donc encore dans le milieu une ou des substance(s) permettant la survie de *B. subtilis* BBG100. L'extrait de levure présent dans le milieu de Landy modifié pourrait être cette source de carbone. De plus, la disparition, lors du dosage, des acides organiques produits indique qu'ils sont eux aussi consommés (Grundy *et al.*, 1993). A 46 h de culture, le phénomène observé d'augmentation du CTR et de l'OTR pourrait être dû soit à la consommation des acides organiques qui se continue, soit à l'apparition d'une nouvelle source de carbone dans le milieu. Cette nouvelle source de carbone peut être consécutive à la mort de cellules via le relargage de protéines. L'utilisation des protéines comme source carbonée peut être appuyée par un rapport CTR/OTR constant et proche d'une zone comprise entre 0,7-0,8. Une autre explication pourrait être la re-consommation d'un produit comme la surfactine comme

proposé comme hypothèse au § 3.3.1.1. Pour finir, la lente descente de l'OTR de la 50<sup>ème</sup> à la 70<sup>ème</sup> heure pourrait indiquer qu'un autre composant du milieu s'avère limitant.

Les deux phases distinguées au cours de l'analyse des gaz se retrouvent lors de la production de mycosubtiline (figure 36) où deux pentes de production distinctes sont observées. En effet, une première pente de production est observée durant la phase de croissance du microorganisme et une seconde ensuite, la première étant supérieure à la seconde. La figure 36 indique que la mycosubtiline continue d'être produite par la souche de *B. subtilis* BBG100 durant la phase stationnaire. La diminution de la concentration en mycosubtiline observée au § 3.3.1.1. lorsque la phase stationnaire se prolonge n'est pas observée ici probablement en raison de l'utilisation du milieu de Landy modifié.

D'après les résultats d'analyse des transferts d'oxygène obtenus grâce au système RAMOS, la concomitance entre le ralentissement de la croissance apparaissant quelques heures après le début de la phase exponentielle de croissance et la limitation en oxygène semble être établie, la limitation en oxygène apparaissant nettement après 5 h de fermentation.

### 3.7.3.2. SUR MILIEU DE LANDY MODIFIE ADDITIONNE D'ISOLEUCINE

L'expérience du 3.7.3.1 est répétée en milieu de Landy modifié additionné d'isoleucine 2 g/L et tamponné par du MOPS 100 mM pH 7,0.

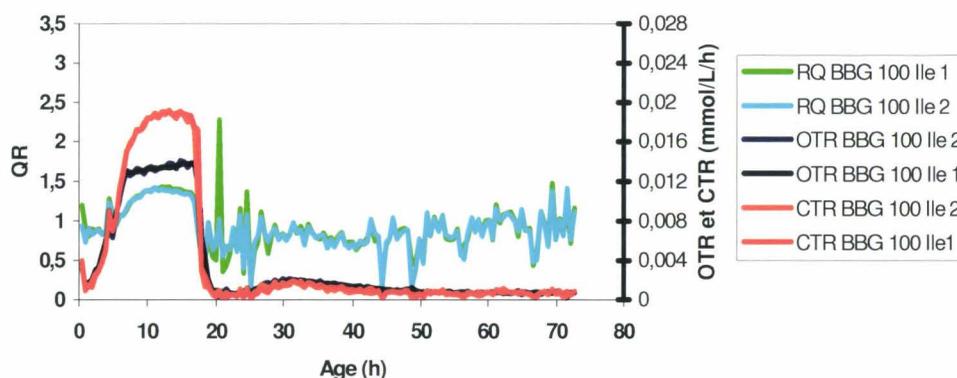


Figure 37 : Evolution du taux de transfert d'oxygène (OTR en mol/L/h), de dioxyde de carbone (CTR en mol/L/h) et du quotient respiratoire lors de cultures en fioles RAMOS de la souche *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné d'isoleucine à 2 g/L. et de MOPS 100 mM pH 7.0

Les évolutions du taux de transfert d'oxygène (OTR en mol/L/h), de dioxyde de carbone (CTR en mol/L/h) et du quotient respiratoire (rapport entre CTR et OTR) sont représentées sur la figure 37.

- Analyse des gaz jusqu'à 20 h de culture.

De même que pour l'expérience précédente, une forte croissance sur glucose est clairement observée de 0 à 20h. Après environ 5 h, le taux de transfert en oxygène arrive à son maximum et un plateau à  $0,014 \text{ mol d'O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  est de nouveau observé (figure 37). Ceci indique une limitation en oxygène. Elle est accompagnée d'une faible production d'acide acétique.

- Analyse des gaz après 20 h de fermentation.

L'analyse physiologique est identique à celle faite pour l'expérience précédente à la différence qu'aucune reprise de l'activité respiratoire n'est observée à 48 h. Le pic de production d'acide accompagnant cette reprise n'est donc pas observé (figure 38).

La production en mycosubtiline est sensiblement plus élevée que pour l'expérience précédente (figure 39). Compte tenu de la variabilité observée sur ce paramètre, voir § 3.3.1.1. cette différence peut ne pas être significative. Cependant, l'hypothèse qu'une absence de production d'acides organiques favorise la synthèse de mycosubtiline est envisageable car la perte énergétique serait moindre.

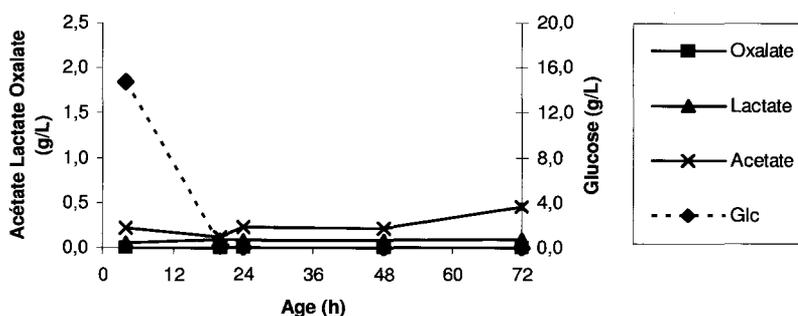


Figure 38 : Evolution des concentrations (g/L) en glucose (Glc), acide oxalique, acide lactique et acide acétique lors de cultures en fioles RAMOS de la souche *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné d'isoleucine à 2 g/L et de MOPS 100 mM pH 7.0

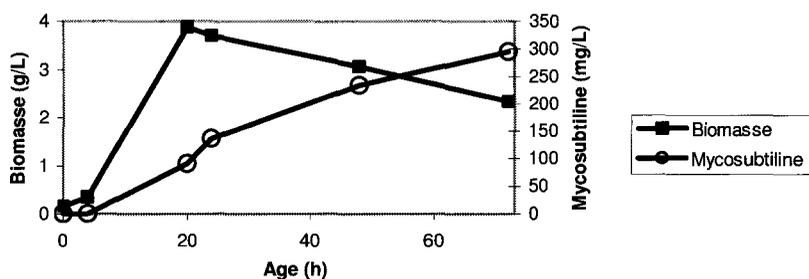


Figure 39 : Evolution de la concentration cellulaire (g/L) et en mycosubtiline (mg/L) lors de cultures en fioles RAMOS de la souche *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné d'isoleucine à 2 g/L et de MOPS 100 mM pH 7.0

Les résultats du § 3.7.3.1 sont confirmés dans cette expérience. Une limitation en oxygène apparaît en effet nettement après 5 h de fermentation.

### 3.7.4. INFLUENCE DU TRANSFERT EN OXYGENE SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE

#### 3.7.4.1. CARACTERISATION DES DIFFERENTS NIVEAUX DE LIMITATION EN OXYGENE

Dans cette étude, plusieurs cinétiques de consommation d'oxygène ont été réalisées. Les deux souches de *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 sont cultivées dans des fioles RAMOS contenant du milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique 2 g/L et de MOPS 100 mM pH 7,0. L'extrait de levure a été retiré du milieu de culture dans ces expériences afin de mieux d'obtenir une composition mieux définie du milieu de culture. L'effet spécifique du retrait de l'extrait de levure du milieu de culture sera traité dans les expériences préliminaires de l'étude en transcriptomique au § 4.2.1.

Pour chacune des deux souches testées, quatre conditions différentes de limitation en oxygène sont étudiées : quatre fioles RAMOS, sous monitoring des gaz, sont préparées comme décrit au § 2.6.4.2. avec quatre volumes de remplissage différents : 10 mL, 25 mL, 42 mL et 60 mL. Pour chaque expérience, trois fioles « sacrifices » évoluent en parallèle dans les mêmes conditions afin de réaliser les échantillonnages. Ceci permet de ne pas modifier le

volume de culture et donc les transferts d'oxygène. Les taux de transfert en O<sub>2</sub> (OTR) sont représentés sur la figure 40.

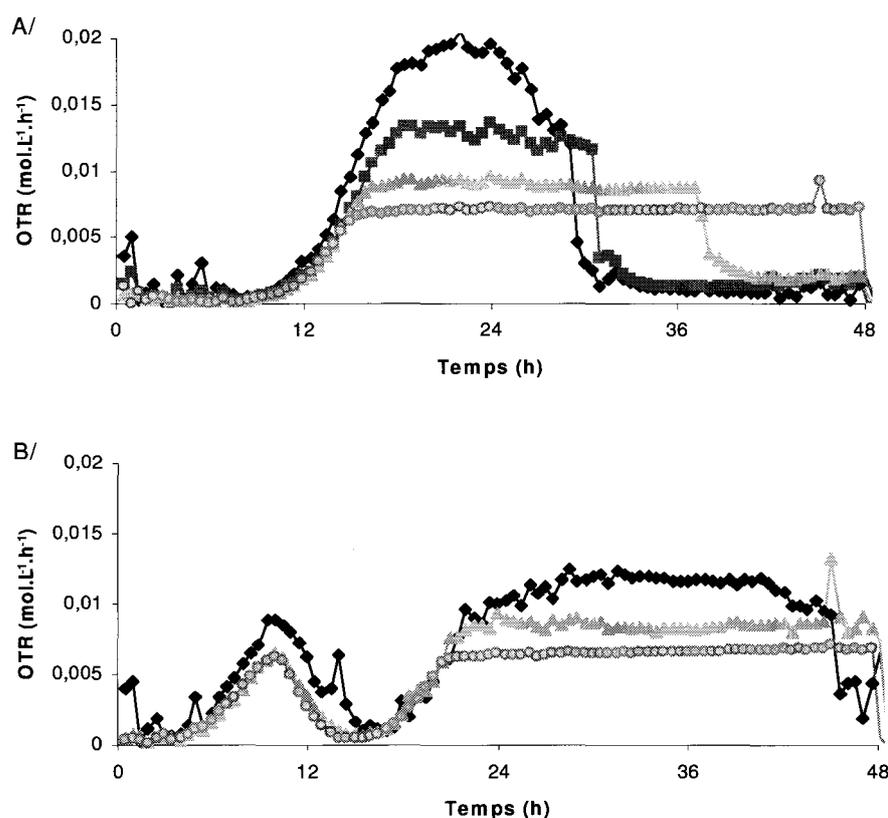


Figure 40 : Evolution du taux de transfert en oxygène (OTR) pour les cultures en milieu Landy modifié, sans extrait de levure, additionné d'acide glutamique à 2 g/L et MOPS 100 mM pH 7.0 de *B. subtilis* ATCC 6633 (A/) et BBG100 (B/) pour différents volumes de remplissage 10 mL (◆), 25 mL (■), 42 mL (▲) et 60 mL (●)

Les différents volumes de remplissage de 10 mL, 25 mL, 42 mL et 60 mL des fioles RAMOS ont respectivement permis d'obtenir des conditions d'OTR limitantes à 20, 14, 9 et 7 mmol d'O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Pour la souche ATCC 6633, après une longue période de latence de 10 h due à l'absence d'extrait de levure dans le milieu de culture, on observe une augmentation de la

consommation en oxygène en corrélation avec l'augmentation de la biomasse, jusqu'à atteindre la vitesse maximale de transfert en oxygène après 16-18 h de culture : le plateau observé indique une limitation en oxygène. On remarque ensuite une diminution successive de la valeur de l'OTR à partir de 24 h pour les expériences correspondant à un volume de remplissage de 10, 25 et 42 mL. Cette observation s'explique par la consommation totale du glucose, source carbonée du milieu. En revanche, pour l'expérience avec un volume de culture de 60 mL, la culture est arrêtée avant la consommation entière du glucose. En effet, il reste 0,48 g/L de glucose disponible dans le milieu au bout de 48 h.

Pour la souche BBG100, la période de latence ne dure que 4 h. Cette différence avec la souche ATCC 6633 reste inexplicée. Une première augmentation de l'OTR est observée mais la consommation en oxygène diminue avant de redémarrer dans un deuxième temps. Il apparaît que les profils des courbes « en deux temps » obtenus avec BBG100 sont différents de ceux, plus classiques, obtenus avec ATCC 6633. Pourtant leur reproductibilité n'est pas à mettre en cause. En effet, les cultures de BBG100 sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique 2 g/L et MOPS 100 mM pH 7,0 montrées au § 3.7.3.1. présentent les mêmes allures « en deux temps ». Il semblerait donc que la surexpression de la mycosubtiline synthétase et la surproduction de mycosubtiline qui en résulte aient un impact important sur la physiologie de *B. subtilis* BBG100. A ce niveau, nous pouvons former l'hypothèse que le pompage des précurseurs de type acide aminé ou acide gras constitutifs de la mycosubtiline déséquilibre et impacte fortement le métabolisme central de cette souche.

La limitation en oxygène est obtenue après 20 h de culture correspondant à des valeurs d'OTR de 9 et 7 mmol.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour les expériences respectives à 42 et 60 mL de milieu de culture. Aucune limitation n'a pu être observée pour l'expérience à 10 mL. Aucun résultat n'est présenté pour l'expérience à 25 mL en raison de l'apparition de spores observées lors du contrôle effectué au microscope.

#### 3.7.4.2. EFFET SUR LA PRODUCTION EN MYCOSUBTILINE ET SURFACTINE

Les productions en mycosubtiline et surfactine pour ATCC 6633 et BBG100 dans les différentes conditions de limitations en oxygène correspondantes aux volumes de remplissage de 10 mL, 25 mL, 42 mL et 60 mL sont présentées sur les figures 41 et 42.

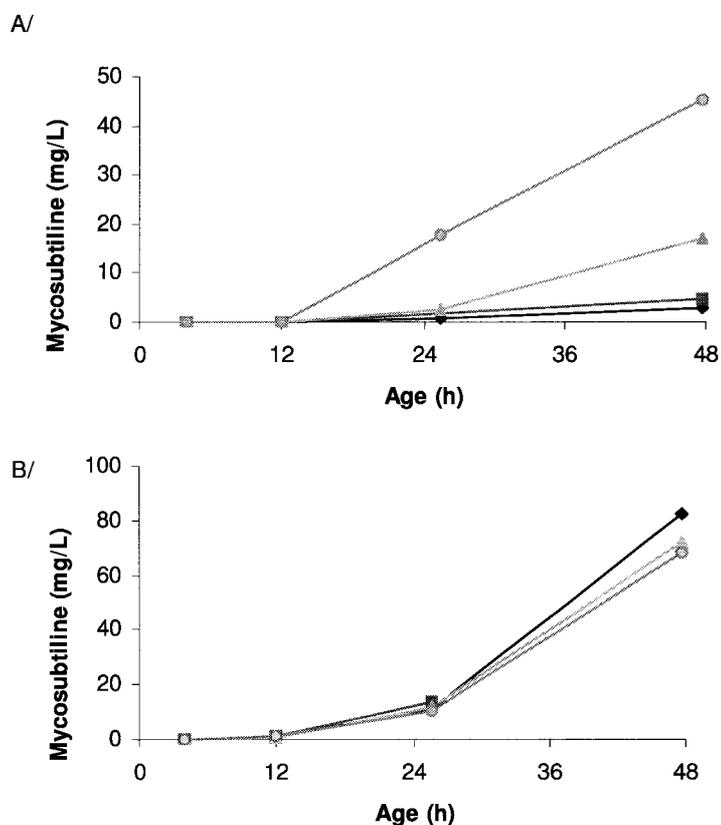


Figure 41 : Evolution de la production de mycosubtiline en fonction du temps chez *B. subtilis* ATCC 6633 (A) et BBG100 (B) pour différents volumes de remplissage de 10 mL (◆), 25 mL (■), 42 mL (▲) et 60 mL (●)

L'évolution des courbes présentées sur la figure 41 A/ montre que le taux de transfert en oxygène a une forte influence sur la production de mycosubtiline chez ATCC 6633. La production est plus élevée lorsque la limitation en oxygène est plus importante. La condition la plus stricte correspondant à un volume de culture de 60 mL, permet d'atteindre une valeur de 45 mg/L, soit une augmentation d'un facteur 16 par rapport à la condition la moins stricte. Cette différence pourrait être plus élevée à 72 h mais le nombre de fioles sacrificielles permettant de réaliser l'échantillonnage étant limité dans le système RAMOS, cela n'a pu être réalisé.

En revanche, les résultats obtenus pour la souche BBG100 démontre qu'il n'y a vraisemblablement aucun effet de la limitation en oxygène sur la synthèse de mycosubtiline. Pour chacune des conditions testées, les productions en mycosubtiline atteignent des valeurs équivalentes comprises entre 70 et 80 mg/L. Ces valeurs sont inférieures à celle de 239 mg/L obtenues au § 3.7.3.1 car l'extrait de levure a été retiré du milieu de culture se traduisant par une baisse de la production, voir § 4.1. De plus, les analyses de mycosubtiline ont été réalisées après 48 h de culture au lieu de 72 h au § 3.7.3.1.

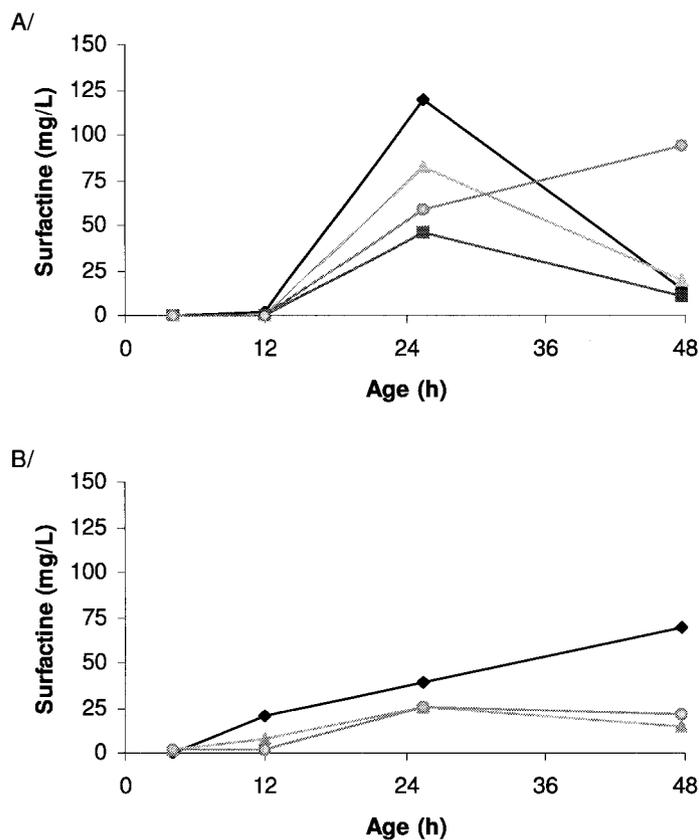


Figure 42 : Evolution de la production de surfactine en fonction du temps chez *B. subtilis* ATCC 6633 (A) et BBG100 (B) pour différents volumes de remplissage de 10 mL (◆), 25 mL (■), 42 mL (▲) et 60 mL (●)

La figure 42 A/ montre que lorsqu'il y a carence en source carbonée, *i.e.* les expériences avec un volume de remplissage des fioles RAMOS de 10 mL, 25 mL et 42 mL,

une disparition de la surfactine est observée. Ce phénomène observé au § 3.3.1.1. pourrait être dû à la consommation des surfactines par le microorganisme dans des conditions de substrat carbonné limitante. Il rend l'analyse des cinétiques de production des figures 42 A/ et B/ difficile pour ce lipopeptide dans ces conditions de travail.

Connaissant l'importance de l'influence du pH sur la production de mycosubtiline par *B. subtilis* ATCC 6633, voir § 3.3., nous avons réalisé le suivi de ce paramètre lors de ces cultures (figure 43).

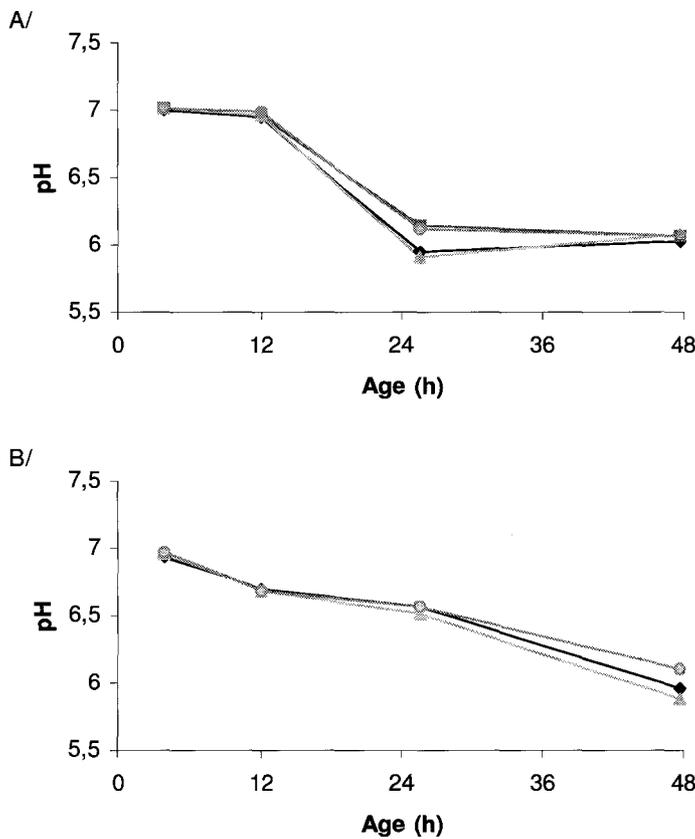


Figure 43 : Evolution du pH du milieu de culture en fonction du temps chez *B. subtilis* ATCC 6633 (A/) et BBG100 (B/) pour différents volumes de remplissage de 10 mL (◆), 25 mL (■), 42 mL (▲) et 60 mL (●)

Les évolutions quasi-similaires du pH au cours des cultures d'ATCC 6633 permettent de valider la comparaison des différents niveaux de production réalisés en fonction de la tension de la limitation en oxygène. Il en est de même pour la souche BBG100.

#### 3.7.4.3. Valorisation des résultats

Les résultats présentés dans le § 3.7.4. ont été obtenus conjointement par le laboratoire ProBioGEM et le laboratoire de Génie Biochimique du RWTH à Aix-la Chapelle, en Allemagne, dans le cadre d'une collaboration. Ils ont fait l'objet d'un article soumis en septembre 2007 dans le «Journal of Biotechnology».

#### 3.7.4.3. EN BREF

Cette étude a permis de démontrer le rôle important de la disponibilité en oxygène sur la production de mycosubtiline chez *B. subtilis* ATCC 6633. Une diminution d'un facteur 16 de la quantité de mycosubtiline produite est observée dans le cas d'une faible limitation en oxygène. Aucun effet de la limitation en oxygène n'a été constaté chez BBG100. Cette souche se différencie de la souche ATCC 6633 par la présence du promoteur fort constitutif  $P_{repU}$  à la place du promoteur natif  $P_{myc}$  devant l'opéron qui contient les gènes codant pour la mycosubtiline synthétase. On l'a vu au § 3.7.4.1., cette expression dérégulée de *myc* impacte visiblement fortement sur la physiologie de BBG100. Ainsi, on peut supposer, qu'à un niveau transcriptionnel, l'oxygène interfère directement ou indirectement sur la régulation du promoteur natif  $P_{myc}$ . Une autre hypothèse serait que différents niveaux de transferts en oxygène influencent l'approvisionnement des précurseurs de type acides gras ou acides aminés constitutifs de la mycosubtiline.

Concernant la préparation de l'étude visant à quantifier l'expression des gènes par la transcriptomique, nous veillerons à ce que les cultures en fioles de *B. subtilis* ATCC 6633 soient réalisées dans des conditions de fortes limitations en oxygène en augmentant le volume de remplissage des fioles.

### 3.8. CONCLUSION

L'étude de l'activité biologique des mycosubtilines a confirmé d'une part l'étendue du spectre d'action antifongique, et a montré d'autre part le fort pouvoir de l'isoforme *anteisoC-17* vis à vis de *Botrytis cinerea*. L'étude de l'influence des effets environnementaux sur la production de mycosubtiline par *B. subtilis* ATCC 6633 et son dérivé BBG100 a permis d'optimiser la sélectivité et la productivité de la biosynthèse. En résumé, il est proposé pour la suite de l'étude de modifier le milieu de Landy en remplaçant l'acide glutamique par du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , de tamponner le milieu avec du MOPS 100 mM à pH 7,0 et d'arrêter les cultures après 48 h de croissance. L'ajout de valine ou d'isoleucine doit permettre ensuite d'orienter sélectivement la synthèse vers les isoformes *isoC-16* et *anteisoC-17* de la mycosubtiline. Une augmentation de la productivité peut être obtenue en augmentant le volume de remplissage des fioles. Ces conditions seront transposées dans la suite du travail afin de mettre plus particulièrement en évidence les mécanismes permettant la synthèse sélective de mycosubtiline *anteisoC-17*.

**CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA REGULATION DE LA  
SYNTHESE DE MYCOSUBTILINE PAR *B. SUBTILIS***

## **4. ETUDE DE LA REGULATION DE LA SYNTHÈSE DE MYCOSUBTILINE PAR *B. SUBTILIS***

### **4.1. INTRODUCTION**

L'approche développée dans le chapitre précédent a permis la détermination des conditions d'obtention sélective de mycosubtiline *anteisoC-17* (ou phénotype désiré) par *B. subtilis* ATCC 6633. Il s'agit dans le présent chapitre de tester une approche en deux temps qui devra permettre de former des hypothèses sur les mécanismes de régulation puis de valider ces hypothèses.

La première étape a pour objectif de lister une série de gènes exprimés différemment entre deux conditions expérimentales, l'une témoin et l'autre permettant l'obtention du phénotype désiré. Cette étape est rendue possible grâce à une analyse du transcriptome. Une seconde étape consistera à reproduire les conditions d'obtention de la mycosubtiline *anteisoC-17* en utilisant les connaissances générées par l'étape de transcriptomique.

### **4.2. TRAVAUX PRELIMINAIRES**

#### **4.2.1. EFFET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE**

L'extrait de levure est un extrait hydrosoluble préparé à partir d'un lysat de levure, source notamment d'acides aminés libres, de peptides et de facteurs de croissance. Ainsi, de par sa composition riche en molécules organiques azotées, ce composé peut influencer la réponse physiologique du microorganisme, plus particulièrement la synthèse de mycosubtiline. En effet, la dégradation de certains acides aminés conduit à la formation d'intermédiaires métaboliques utiles à la synthèse d'isoformes spécifiques de la mycosubtiline (Besson *et al.*, 1992). Dans le but d'étudier par la suite par analyse transcriptomique les gènes influençant la synthèse de mycosubtiline, il est nécessaire d'effectuer des cultures dans un milieu sans extrait de levure afin de ne pas influencer la sélectivité de production d'une ou

plusieurs isoformes en mycosubtiline. Par conséquent, nous avons évalué l'effet de l'extrait de levure sur la production de mycosubtiline par les souches *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100.

Les résultats obtenus après dosage par CLHP de la quantité de mycosubtiline produite après 48 h de culture sont présentés dans le tableau 17. Le milieu de culture est additionné ou non de 1 g/L d'extrait de levure, complétement avec du MOPS 100 mM et le pH est ajusté à 7,0.

Tableau 17 : Production en mycosubtiline des souches *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 en présence ou non d'extrait de levure dans le milieu Landy modifié après 48h de culture en fioles d'Erlenmeyer

	Production en mycosubtiline (mg/L)	
	ATCC 6633	BBG100
Milieux de Landy, MOPS 100 mM pH 7,0 avec extrait de levure (1 g/L)	28	102
Milieux de Landy, MOPS 100 mM pH 7,0 sans extrait de levure	1,4	27

D'après ces résultats, ATCC 6633 et BBG100 produisent des quantités plus importantes de mycosubtiline en présence d'extrait de levure à une concentration de 1 g/L dans le milieu de culture. Il est à noter que l'absence d'extrait de levure a un effet important sur la croissance bactérienne puisqu'un allongement de la phase de latence de quelques heures est constaté ainsi qu'une moins grande reproductibilité dans les résultats expérimentaux.

La même expérience est réalisée en fioles RAMOS selon le protocole décrit au § 2.6.4.2. Les productions en mycosubtiline après 30 h de culture en fioles RAMOS sont exposées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Production en mycosubtiline des souches *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 en fonction de la présence ou l'absence d'extrait de levure dans le milieu Landy modifié après 30 h de culture en fioles RAMOS

	Production en mycosubtiline (mg/L)	
	ATCC 6633	BBG100
Milieux de Landy, MOPS 100 mM pH 7,0 avec extrait de levure (1 g/L)	17	79
Milieux de Landy, MOPS 100 mM pH 7,0 sans extrait de levure	0,9	34

Les résultats présentés confirment l'importance de l'extrait de levure comme source complexe organique utilisable par *B. subtilis* pour la synthèse de la mycosubtiline.

Pour la réalisation des cultures servant à l'étude transcriptomique sur biopuces, il sera possible d'effectuer les cultures dans un milieu ne contenant pas d'extrait de levure. En effet, les valeurs de production de mycosubtiline, plus faibles sans extrait de levure, restent cependant assez élevées pour envisager l'étude du niveau d'expression des gènes. De plus, l'écart du niveau de production entre la souche sauvage et le mutant surproducteur est amplifié pour des cultures sans l'utilisation d'extrait de levure.

#### 4.2.2. OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ARN

Les travaux préliminaires d'extraction des ARN au phénol (protocole Eurogentec) n'ont pas permis de récupérer plus de quelques dixièmes de µg d'ARN avec la souche ATCC 6633. Une étude récente montre les difficultés à utiliser des protocoles « classiques » de biologie moléculaire avec une souche naturelle comme ATCC 6633 (Duitman *et al.*, 2007).

##### 4.2.2.1. KIT RNAEASY DE QIAGEN

L'extraction avec le kit RNeasy midi kit de Qiagen s'est effectuée selon le protocole décrit au § 2.4.1.2. en combinant une lyse chimique à une lyse mécanique par billes de verre.

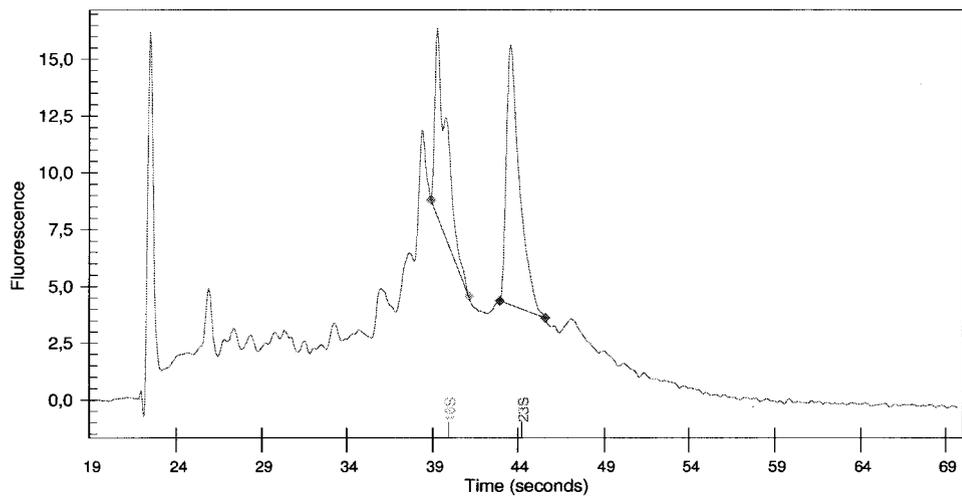
Afin de figer le transcriptome, le volume de culture prélevé a été préalablement traité par une solution saline RNA Protect Bacteria de Qiagen, voir § 2.4.1.1. L'extraction s'est réalisée sur  $5.10^9$  cellules (1 unité de DO représente  $1,3.10^8$  cellules).

Afin d'évaluer la quantité et la qualité des ARNt totaux extraits, des contrôles ont été effectués en spectrophotométrie. Le tableau 19 donne les quantités d'ARN totaux extraits et les résultats des rapports d'absorbance 260/280 (nm) et 260/230 (nm).

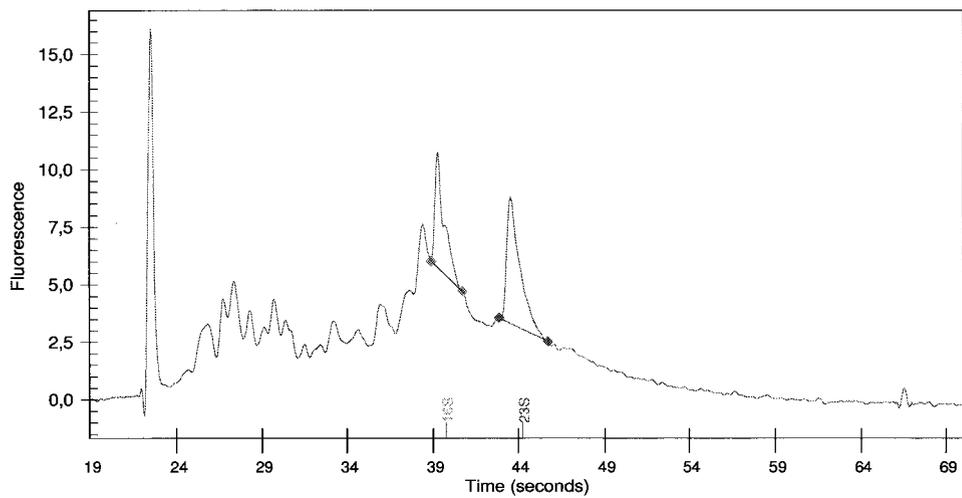
*Tableau 19 : Quantités d'ARN totaux extraits et rapports d'absorbance 260/280 (nm) et 260/230 (nm). Echantillons prélevés sur des cultures de B. subtilis BBG100 en milieu de Landy modifié additionné de MOPS 100 mM, pH=7,0 et d'acide glutamique ou d'isoleucine à 2 g/L.*

Milieu de Landy modifié + MOPS 100 mM pH 7,0	Quantité d'ARN totaux ( $\mu\text{g}$ )	Rapport 260/280	Rapport 260/230
+ acide glutamique 2 g/L	33	2,17	2,30
+ isoleucine 2 g/L	40	2,16	2,30

L'extraction a permis de récupérer entre 33 et 40  $\mu\text{g}$  d'ARN totaux. Ces quantités sont suffisantes pour la suite de l'étude en transcriptomique puisque seulement 5 à 10  $\mu\text{g}$  sont hybridés par lame. Les ARN totaux obtenus ont aussi un niveau de pureté acceptable. Afin de vérifier l'intégrité des ARN extraits, une électrophorèse capillaire a été réalisée selon le protocole décrit au § 2.4.3.2. (figure 44).



Condition additionnée d'isoleucine ; rapport 23S/16S = 1,4



Condition additionnée d'acide glutamique ; rapport 23S/16S = 1,4

Figure 44 : Représentation de la fluorescence (FU) en fonction du temps émise par les ARN totaux obtenus par électrophorèse capillaire à partir d'échantillons prélevés sur des cultures de *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné de MOPS 100 mM, pH=7,0 et d'acide glutamique ou d'isoleucine à 2 g/L.

Le profil des courbes présentées a pour caractéristique principale d'avoir une ligne de base très élevée. De plus, le pic 16S est semble-t-il scindé en deux. Ces deux phénomènes

indiquent une dégradation des ARN<sub>tot</sub> et donc très probablement des ARN<sub>m</sub>. Ces expériences ont été reproduites en modifiant le temps d'agitation, le protocole de lavage des billes ou en diminuant le temps d'exécution mais sans améliorer le résultat. Par conséquent, il a été proposé de tester un nouveau kit de préparation des ARN où les billes de verres sont remplacées par des billes de zirconium.

#### 4.2.2.2. KIT RIBOPURE BACTERIA D'AMBION

Seulement 1,6 µg d'ARN a pu être extrait à partir d'un culot de  $5.10^8$  cellules en suivant le protocole standard proposé par Ambion décrit au § 2.4.2.. Il s'est avéré que la faible quantité d'ARN extraits était liée à la lyse non totale des cellules après passage 10 min au Mixer1000 en présence de billes de zirconium. Cependant, une qualité acceptable des ARN a justifié une optimisation du protocole d'extraction.

##### 4.2.2.2.1. Variation du temps de passage au Mixer1000

Le protocole d'Ambion précise que pour les bactéries telles que *B. subtilis*, la lyse des cellules peut-être difficile et qu'il est possible dans ce cas d'augmenter le temps de passage au Mixer1000 afin d'optimiser la lyse cellulaire. A partir de culots cellulaires de  $5.10^8$ , deux conditions de durée d'agitation sont testées : 10 min et 30 min. Les résultats obtenus sont exposés sur le tableau 20.

Tableau 20 : Quantités d'ARN totaux (µg) extraits et rapports d'absorbance 260/280 (nm) et 260/230 (nm). Échantillons prélevés sur des cultures de *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié additionné de MOPS 100 mM, pH=7,0.

Condition	Quantité d'ARN totaux extraits ( µg)	Rapport 23S/16S
10 min d'agitation au Mixer1000	1,2	1,61
30 min d'agitation au Mixer1000	5,7	1,5

L'augmentation du temps de passage des cellules au Mixer 1000 influe visiblement sur l'efficacité de lyse des cellules et se traduit par une augmentation de la quantité d'ARN récupérée. Cependant, les quantités sont encore trop faibles.

#### 4.2.2.2.2. Test de lyse enzymatique via l'ajout de lysozyme

Une étape de lyse enzymatique des cellules par ajout de 50  $\mu$ L de lysozyme pour une concentration finale de 10 g/L est testée sur des culots de  $5.10^8$  cellules. Le lysozyme est ajouté avant la lyse mécanique des cellules par agitation au Mixer1000 en présence de billes de zirconium. Plusieurs conditions d'extraction sont testées et les résultats sont récapitulés dans le tableau 21.

Tableau 21 : Quantités d'ARN extraits ( $\mu$ g) et rapports d'absorbance 260/280 (nm) et rapport d'intensité 23S/16S pour différentes conditions d'extraction des ARN réalisées sur des culots cellulaires de *B. subtilis* BBG100 cultivé en milieu de Landy modifié additionné de MOPS 100 mM, pH=7,0.

		Quantité d'ARN extraits (en $\mu$ g)	Rapport 260/280	Rapport 23S/16S
<b>ajout de lysozyme sans incubation</b>	10 min d'agitation	3,8	2,07	1,98
	30 min d'agitation	7,5	2,08	1,83
<b>incubation 10 min avec le lysozyme</b>	10 min d'agitation	25	2,13	1,71
	30 min d'agitation	22,5	2,14	1,24
<b>incubation 30 mn avec le lysozyme</b>	10 min d'agitation	5,7	2,11	1,04
	30 min d'agitation	9,5	2,12	1,32

Le tableau 21 montre que l'incubation 10 min en présence de lysozyme couplée à une lyse mécanique de 10 min augmente nettement la lyse cellulaire puisqu'on obtient 25 µg d'ARN totaux. L'expérience répétée plusieurs fois à partir d'échantillons provenant de cultures différentes montrera des fluctuations de ce résultat d'un facteur allant jusqu'à 2, soit 12,5 µg récupérés.

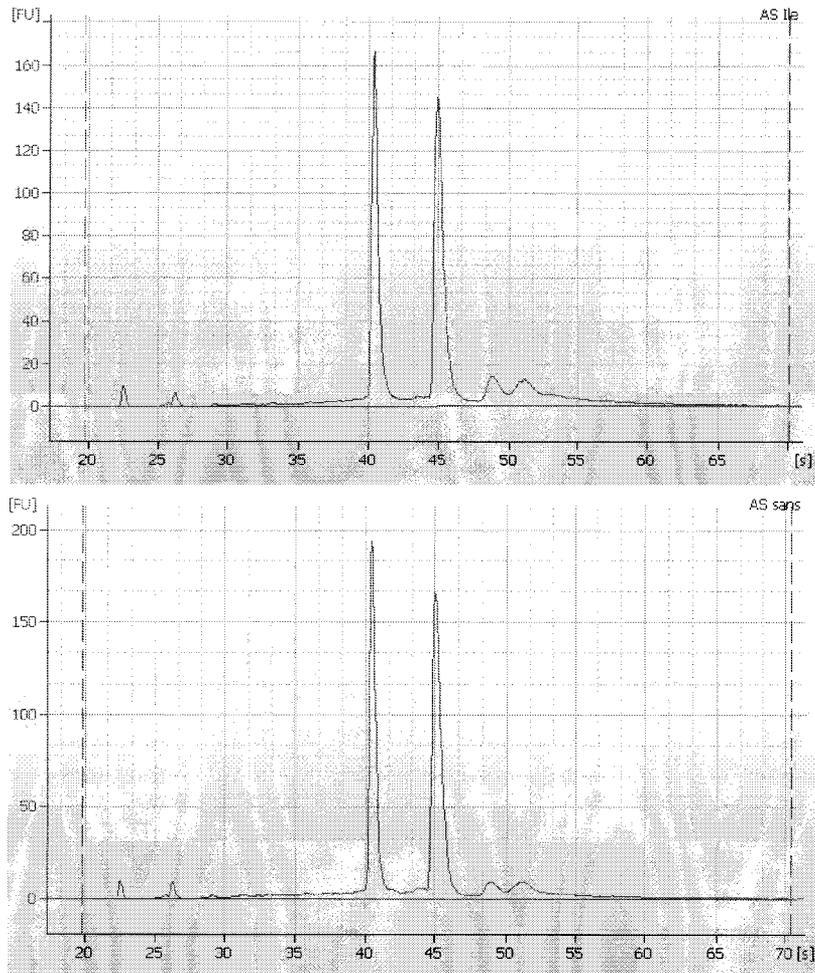


Figure 45 : Représentation de la fluorescence (FU) en fonction du temps émise par les ARN totaux obtenus par électrophorèse capillaire à partir d'échantillons à partir de culots cellulaires de *B. subtilis* BBG100 cultivée en milieu de Landy modifié additionné de MOPS 100 mM, pH=7,0 avec 10 min d'incubation avec du lysozyme et 10 min de passage au Mixer1000

La figure 45 expose le résultat des analyses par électrophorèse capillaire réalisées afin de contrôler la qualité des ARN selon la méthode décrite au § 2.4.3.2. Les courbes présentées ont pour caractéristique principale d'avoir une ligne de base quasi-linéaire et proche de zéro. Le pic 16S n'est plus scindé en deux comme au § 4.2.2.1. Ces deux critères indiquent une bonne qualité des ARN<sub>tot</sub> et donc probablement une bonne conservation des ARNm.

#### 4.2.2.2.3. Variation du nombre de cellules

Afin d'obtenir plus d'ARN, une variation du nombre de cellules utilisées pour l'extraction des ARN a été testée avec la meilleure condition d'extraction définie précédemment. Ainsi, des culots de  $5 \cdot 10^8$ ,  $1 \cdot 10^9$  et  $2 \cdot 10^9$  cellules sont bloqués dans le RNALater suite à des cultures en fioles réalisées avec la souche BBG100. Le tableau 22 présente les résultats obtenus lors de cette expérience.

Tableau 22 : Quantités d'ARN extraits ( $\mu\text{g}$ ) et rapports d'absorbance 260/280 (nm) pour différentes conditions d'extraction des ARN réalisées sur des culots cellulaires de *B. subtilis* BBG100 cultivé dans un milieu Landy modifié+ lysozyme (10 mg/mL), agitation 10 min au Mixer100

Condition	Quantité d'ARN totaux extraits (en $\mu\text{g}$ )	Rapport d'absorbance 260/280
<b>Culot <math>5 \cdot 10^8</math> cellules</b>	12,8	2,18
<b>Culot <math>1 \cdot 10^9</math> cellules</b>	21,3	2,14
<b>Culot <math>2 \cdot 10^9</math> cellules</b>	10,9	2,17

Les résultats sont cohérents entre  $5 \cdot 10^8$  et  $1 \cdot 10^9$  cellules : la quantité d'ARN extraits a quasiment doublé. Les quantités d'ARN obtenues pour la condition avec  $1 \cdot 10^9$  cellules sont suffisantes pour la réalisation de l'étude sur biopuces. La qualité des ARN est comparable à celle montrée sur la figure précédente. En revanche, avec un culot de  $2 \cdot 10^9$  cellules, non conseillé par le fournisseur, le rendement en ARN chute de façon importante.

#### 4.2.2.3. EN BREF

Afin d'obtenir la quantité et la qualité d'ARN nécessaire à l'étude en transcriptomique, les extractions d'ARN seront réalisées dans la suite du travail avec le kit Ribopure d'Ambion, sur des culots de  $1.10^9$  cellules, mis à incuber 10 min avec 50  $\mu$ L de lysozyme à 10 mg/mL suivis de 10 min d'agitation au Mixer1000.

### **4.2.3. CONSTRUCTION DE LA SOUCHE *B. SUBTILIS* 168 *SFP*<sup>+</sup>**

#### 4.2.3.1. JUSTIFICATIF

Les sondes déposées sur la puce à ADN utilisée dans cette étude correspondent aux ORFs de *B. subtilis* 168, obtenus par PCR à partir d'un mélange d'amorces spécifiques. Or les génomes des souches *B. subtilis* 168 et ATCC 6633 n'ont pas de raison d'être strictement homologues. Pour illustrer ce fait, l'alignement des séquences des ARN 16S des deux espèces montre 96% d'homologie. Il s'agira donc de quantifier le nombre de gènes non étudiables chez ATCC 6633 en raison de leur absence, d'un manque d'homologie entre les ADNc de la sonde et de la cible ou d'un problème lors de la transcription inverse lié à l'utilisation d'amorces spécifiques de *B. subtilis* 168. Pour se placer dans les conditions réelles de l'hybridation sur biopuces, il serait donc intéressant de se constituer un témoin positif via la souche *B. subtilis* 168. Le problème de cette souche est qu'elle possède le gène *sfp* mais ce dernier est muté, *sfp*<sup>0</sup>, et entraîne la formation d'une 4'-PPTase tronquée qui empêche toute synthèse par les voies des NRPS. Il est donc préférable de réactiver la voie des NRPS en intégrant dans la souche *B. subtilis* 168 la séquence d'un gène *sfp* non muté originaire de *B. subtilis* ATCC 21332.

#### 4.2.3.2. OBTENTION DU GENE *SFP* ISSU DE LA SOUCHE *B. SUBTILIS* ATCC 21332

##### 4.2.3.2.1. Amplification par PCR conventionnelle

Après extraction de l'ADN génomique de la souche *B. subtilis* ATCC 21332, voir § 2.3.1., le gène *sfp* a été amplifié par PCR en utilisant les amorces sens « *sfp*-forw » et antisens « *sfp*-rev ».

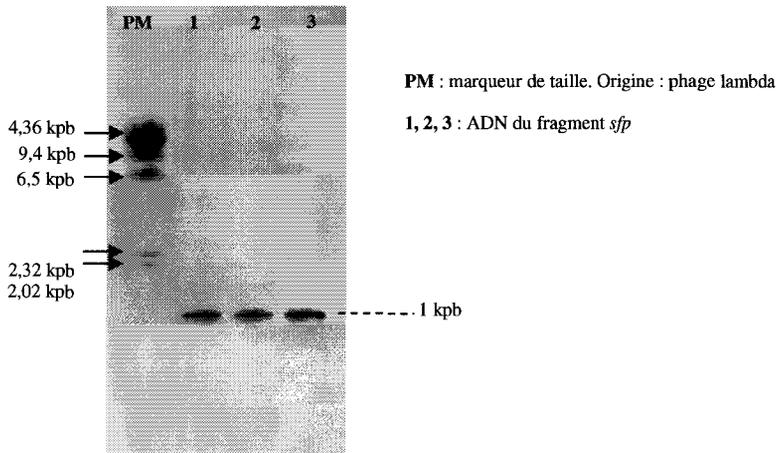


Figure 46 : Gel d'agarose représentant le fragment *sfp* d'ATCC 21332 amplifié par PCR.

Afin de vérifier la taille des fragments amplifiés, une migration électrophorétique des produits de PCR a été effectuée selon le protocole décrit au § 2.3.1. Le gel de la figure 46, confirme la taille du fragment attendu (1122 pb) puisque les produits de PCR font une taille de l'ordre de 1000 pb.

#### 4.2.3.2.2. Tests par restriction

Afin de vérifier que le fragment amplifié contient bien la séquence du gène *sfp*, des tests par restriction, quatre digestions simples et deux doubles, à l'aide des enzymes *Hind*III, *Eco*RV, *Tat*I et *Xba*I ont été réalisés. La taille des fragments attendus après digestion est donnée dans le tableau 23.

Tableau 23 : Tableau répertoriant les enzymes testées sur le fragment *sfp* putatif, le nombre de site de coupures et la taille des fragments digérés obtenus.

Enzyme(s) testée(s)	Nombre de site(s) de coupure	Nombre de fragments obtenus	Taille des fragments (pb)
<i>Xba</i> I	1	2	161 ; 961
<i>Hind</i> III	1	2	503; 619
<i>Tat</i> I	2	3	53; 493; 576
<i>Eco</i> RV	3	4	126; 314; 321; 361
<i>Hind</i> III / <i>Eco</i> RV	4	5	126; 132; 189; 314; 361
<i>Tat</i> I / <i>Xba</i> I	3	4	53; 108; 385; 576

La figure 47 présente le résultat du fragment *sfp* digéré par les diverses enzymes.

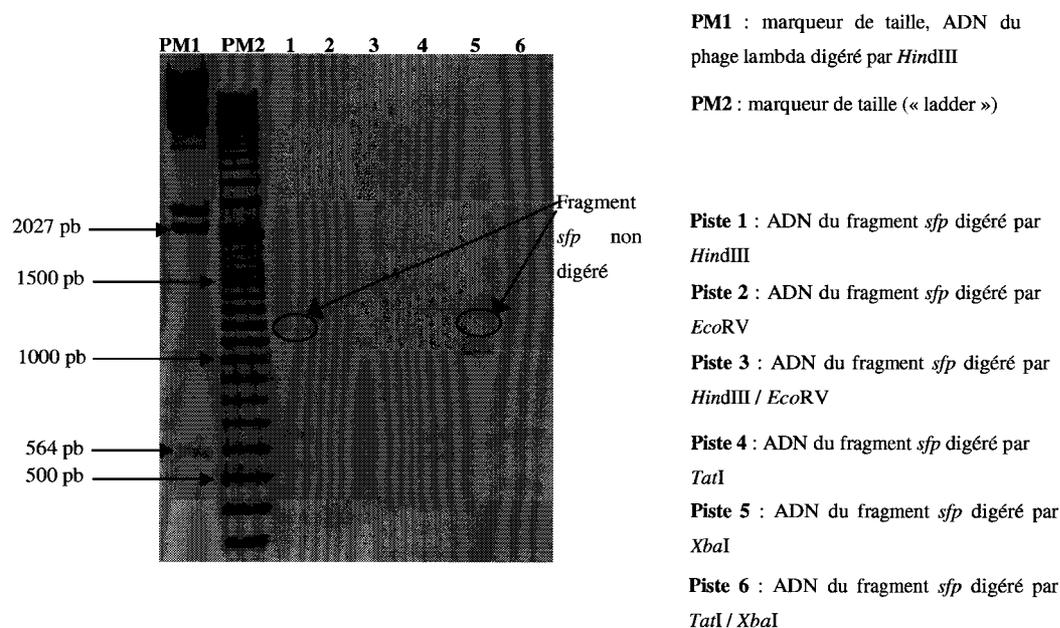


Figure 47 : Résultat de la migration en gel d'agarose à 1% des digestions enzymatiques simples et doubles par *Xba*I, *Hind*III, *Tat*I et *Eco*RV sur le fragment *sfp*.

Mis à part les fragments de petite taille (inférieure à 300 pb) ou les fragments de tailles proches qui se confondent, les digestions attendues sont retrouvées. Par exemple, sur la piste 2, représentant la digestion du fragment *sfp* putatif par l'enzyme *EcoRV*, deux bandes sont visibles : l'une aux environs de 350 pb, correspondant aux deux fragments digérés de 314 pb et 321 pb, et l'autre, aux environs de 400 pb, correspondant au fragment de 361 pb. Sur les pistes 1 et 5, aux environs de 1100 pb, une bande supplémentaire est visible, il s'agit du fragment *sfp* non digéré. Les deux enzymes *HindIII* et *XbaI* n'ont digéré l'ADN que de manière partielle. Ces tests de digestions enzymatiques confirment que le fragment amplifié par PCR contient bien les séquences du gène *sfp*.

#### 4.2.3.2.3. Clonage du fragment dans le plasmide pGEM-T Easy

Afin de disposer d'une quantité suffisante de fragment contenant *sfp*, ce dernier a été cloné selon le protocole décrit au § 2.3.4 dans un vecteur commercial permettant le clonage direct de produits de PCR : le pGEM-T Easy. Après ligation, le plasmide est introduit dans la souche *E. coli* JM109. Après sélection des colonies positives (blanches) sur LB agar complétement d'ampicilline, de X-Gal et d'IPTG, une extraction des plasmides par méthode « boiling » a été réalisée. Le plasmide pGEM-T Easy contenant le fragment *sfp* (4139 pb) migrera moins loin sur un gel d'électrophorèse que le témoin pUC19 (2686 pb). La figure 48 donne le résultat de la migration sur gel d'agarose des plasmides extraits.

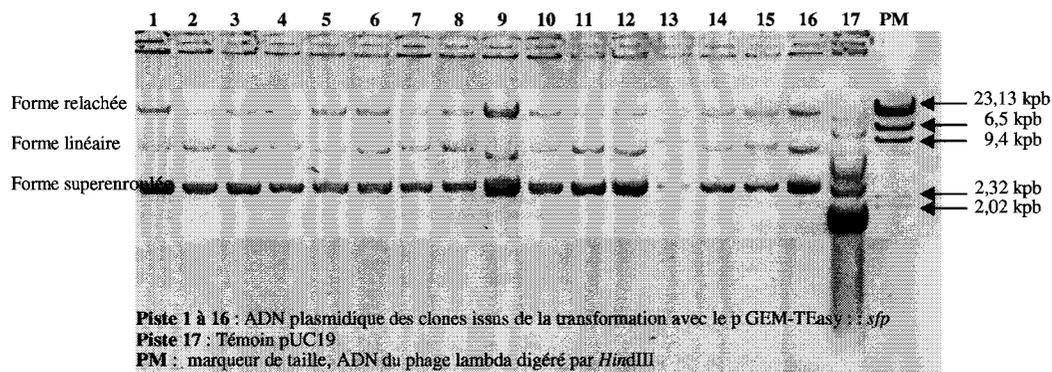


Figure 48 : Résultat de la migration en gel d'agarose à 0,7% des produits plasmidiques après « boiling » sur les clones positifs sur milieu LB complétement en ampicilline, X-Gal et IPTG.

Afin de connaître l'orientation du gène *sfp* dans le pGEM-T Easy, des tests par restriction à l'aide de l'enzyme *TatI* ont été effectués. Les tailles des fragments attendus par digestion sont données dans la figure 49.

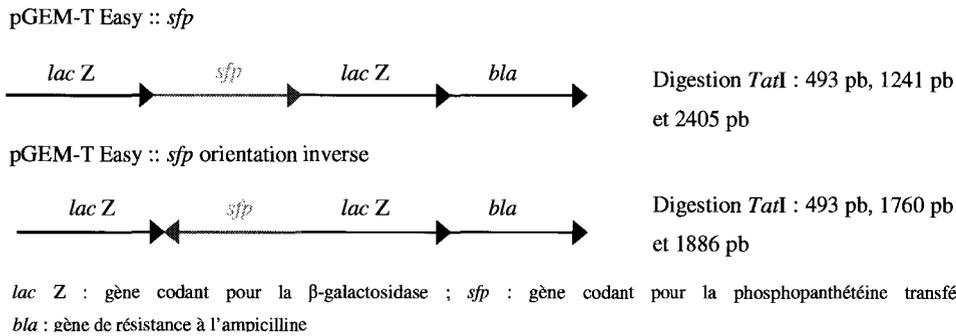


Figure 49 : Orientations possibles du gène *sfp* dans le pGEM-TEasy et taille des fragments attendus après digestion par l'enzyme de restriction *TatI*.

Quatre plasmides extraits du gel présenté sur la figure 48 ont été testés. Le gel d'électrophorèse représenté en figure 50 montre les fragments obtenus après digestion de l'ADN plasmidique par l'enzyme *TatI*.

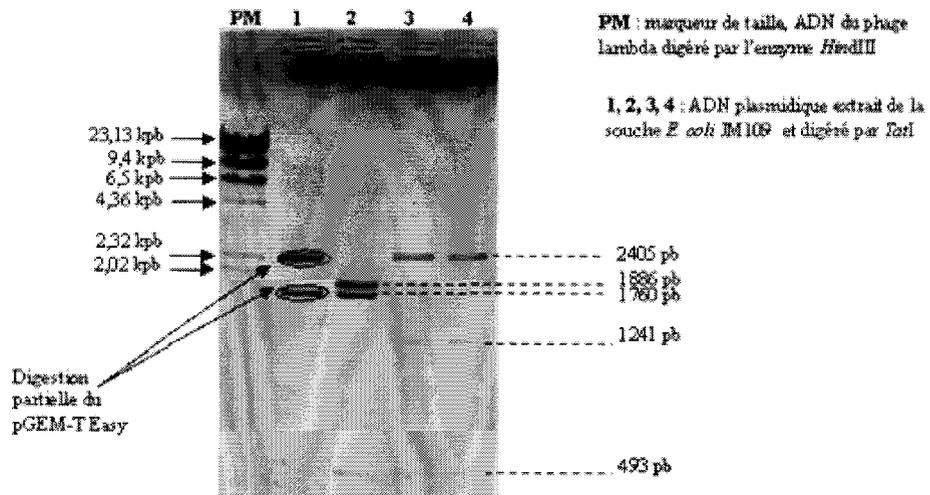


Figure 50 : Gel d'agarose représentant les fragments digérés obtenus après digestion du pGEM-T Easy par l'enzyme *TatI*.

Sur le gel présenté sur la figure 50, deux plasmides possèdent le gène *sfp* inséré dans le même sens que le gène *lac Z* (pistes 3 et 4) et deux autres possèdent le gène *sfp* cloné en orientation inverse du gène *lac Z* (pistes 1 et 2). Sur la piste 1, l'ADN plasmidique n'a été digéré que partiellement ; les fragments d'ADN de 493 pb et de 1760 pb sont absents et forment un fragment partiel d'une taille proche de 2,3 kpb.

#### 4.2.3.2.4. Transformation dans la souche *B. subtilis* 168

Afin d'obtenir une souche de *B. subtilis* 168 possédant le gène *sfp* non muté, des transformations avec le clone portant le plasmide révélé sur la piste 3, appelé pBG114, et avec le fragment *sfp* seul, ont été effectuées. Ces méthodes décrites au § 2.3.5. permettent en théorie de remplacer par recombinaison homologue le gène *sfp*<sup>0</sup> muté de 168 par le gène *sfp* de 21332. La sélection s'est effectuée sur gélose au sang comme précisé au § 2.8.2. En effet, lorsque la souche exprime la 4'-PPTase, la voie NRPS est activée et entraîne la production de lipopeptides dont la surfactine qui présente l'avantage d'exercer une activité hémolytique. Les clones recombinés sont donc ceux capables de provoquer une lyse des hématies, les plages de lyse observables par une transparence de la gélose.

L'avantage de la méthode de clonage choisie est qu'elle permet de ne pas introduire de marqueurs de sélection dans le microorganisme. Mais l'étalement des transformants sur gélose au sang a entraîné une lyse directe des hématies. Cette lyse directe s'est révélée proportionnelle au nombre d'unités formant des colonies étalées sur les géloses. Ce phénomène a rendu fastidieux le processus de sélection en raison de l'obligation d'étaler des suspensions bactériennes très diluées.

Cette stratégie de clonage sera abandonnée après de nombreux essais. D'autres chercheurs du Laboratoire ProBioGEM ont poursuivi ce travail en clonant le fragment *sfp* porté par le plasmide pBG114 dans un vecteur intégratif de *B. subtilis* dérivé du pDG1661 (figure 51), appelé pBG128 [pDG1661  $\Delta$ (*spoVG-lacZ*)]. La délétion de *spoVG-lacZ* a été effectuée après action de l'enzyme *PvuII* et ligature, transformation d'*E. coli*.

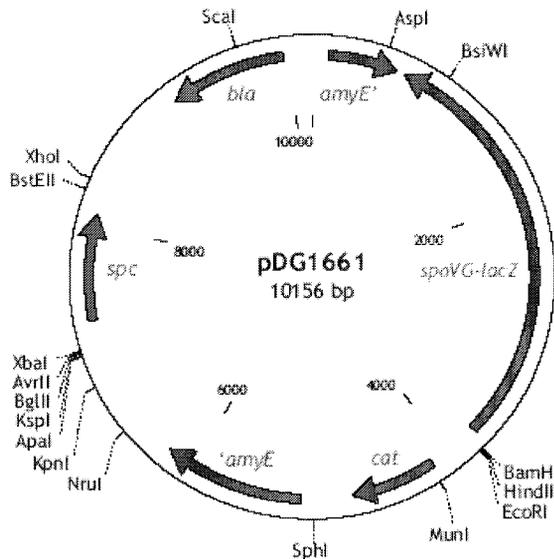


Figure 51 : Carte du plasmide d'intégration pDG1661, ApR, CmR, SpcR, spoVG-lacZ

Le plasmide pBG129 résultant de l'intégration du fragment *sfp* dans pBG128 a ensuite permis l'intégration de *sfp* au locus *amyE* de 168 par recombinaison homologe. Le transformant obtenu a été appelé 168 *sfp*<sup>+</sup>.

#### 4.2.3.3. HYBRIDATION CROISEE SUR LA PUCE EGT 168 DES CIBLES ISSUES D'ATCC 6633 ET 168 *SFP*<sup>+</sup>

Pour les raisons évoquées au § 4.2.3.1., les cibles provenant d'ATCC 6633 et 168 *sfp*<sup>+</sup> ont été hybridées sur la sonde (puce à ADN) construite par dépôt des ORFs de *B. subtilis* 168. Les cibles étudiées sont issues de prélèvements réalisés après trois générations sur des cultures en fioles de *B. subtilis* 168 *sfp*<sup>+</sup> (témoin) et ATCC 6633 (essai) sur milieu de Landy tamponné par du MOPS 100 mM pH 7,0. Les intensités de fluorescence de Cy3 (signal des cibles provenant de 168 *sfp*<sup>+</sup>) et Cy5 (signal des cibles provenant d'ATCC 6633) ont été lues grâce au scanner puis les données traitées avec le logiciel Midas. Tous les spots qui ne se différencient pas du bruit de fond environnant, c'est-à-dire ceux dont la valeur d'intensité rapportée au bruit de fond est inférieure à 1,11 (valeur fixée arbitrairement), ont été exclus. Ce traitement peu stringent doit permettre de ne pas écarter les ADNc marqués par Cy3 ou Cy5 des cibles hybridés sur la puce à ADN, même si le signal est faible.

Tableau 24 : Description des spots présents sur la puce à ADN EGT 168 et identification des spots obtenus sur la puce à ADN EGT 168 hybridée avec les cibles provenant de *B. subtilis* 168 *sfp*<sup>+</sup> (marquage par Cy3) et ATCC 6633 (marquage par Cy5). Les cibles sont issues de prélèvements réalisés après trois temps de génération lors de cultures réalisées de façon concomitante sur milieu de Landy tamponné par du MOPS 100 mM pH 7,0.

	Nombre total de spots	Spots vides	Gènes manquants	Spots de normalisation et de contrôles						Nombre de spots étudiables
				<i>L uc if.</i>	<i>lux A</i>	<i>E. coli</i>	<i>rbc L</i>	<i>rpl L</i>	<i>ilv C</i>	
<b>Puce à ADN 168 EGT. Données fabricant</b>	<b>9216</b>	<b>570</b>	<b>194</b>	<b>12</b>	<b>64</b>	<b>192</b>	<b>64</b>	<b>66</b>	<b>14</b>	<b>8040</b>

Résultats de l'hybridation sur la puce à ADN 168 EGT des cibles issues de 168 *sfp*<sup>+</sup> et d'ATCC 6633 marquées par Cy3 et Cy5.

Pour chacune des cibles marquées par Cy3 ou Cy5, le spot est pris en compte dans l'analyse lorsque l'intensité du signal qu'il émet dépasse de 1,11 fois la valeur du bruit de fond local

<b>Cible marquée par Cy3 issue de 168 <i>sfp</i><sup>+</sup></b>	<b>8460</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>8</b>	<b>64</b>	<b>192</b>	<b>60</b>	<b>66</b>	<b>14</b>	<b>8020</b>
<b>Cible marquée par Cy5 issues d'ATCC 6633</b>	<b>8484</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>12</b>	<b>64</b>	<b>192</b>	<b>59</b>	<b>66</b>	<b>14</b>	<b>8022</b>

Comme le montre le tableau 24, un nombre total de 9216 spots est présent sur la biopuce EGT 168. Chaque gène est déposé en duplicat. Il y a donc théoriquement 4608 gènes étudiables. Cependant, l'étude de la notice technique et du fichier informatique de description

de la puce EGT 168 indique que 570 spots sont vides et 194 correspondent à des gènes manquants ou « missing genes ». De plus, de nombreux spots peuvent être utilisés à des fins de normalisation des résultats ou de contrôle : 12 correspondent à la luciférase, 192 correspondent à du matériel génétique d'*E. coli*, 64 correspondent au gène *luxA*, 64 correspondent au gène *rbcL* de *A. thaliana*, 66 correspondent au gène domestique *rplL* de *B. subtilis* et 14 au gène *ilvC* de *B. subtilis*. Les spots présents sur la biopuce et qui correspondent à des gènes est donc de 8040. Le nombre de gènes étudiables est par conséquent de 4020 gènes.

La partie basse du tableau 24 montre que le nombre de spots allumés suite à l'hybridation sur la puce à ADN 168 EGT des cibles 168 *sfp*<sup>+</sup> (8460 spots) et ATCC 6633 (8484 spots), marquées par Cy3 et Cy5, est similaire. L'hybridation aspécifique sur les spots vides ou sur les spots correspondant à des gènes manquants est aussi du même ordre de grandeur pour les deux cibles. La cible provenant d'ATCC 6633 hybridée sur la puce EGT 168 répond donc de façon similaire à la cible provenant de 168 *sfp*<sup>+</sup>.

Il est à noter que deux spots, correspondant au gène *sbo*, ne sont pas exploitables en raison de la saturation du signal émis par le Cy5 de la cible issue d'ATCC 6633. Six autres spots correspondants aux gènes *rapA*, *ybcP* et *ybcpQ*, ont saturé sur le canal d'émission du Cy3 correspondant à la cible 168 *sfp*<sup>+</sup>. Cette saturation pourrait s'expliquer par une différence dans la séquence de ces gènes entre les deux souches, par exemple une proportion plus élevée de thymidine, qui aurait pour effet de favoriser l'incorporation des marqueurs.

#### 4.2.3.4. EN BREF

La cible provenant d'ATCC 6633 hybridée sur la puce EGT 168 répond de façon similaire à la cible provenant de 168 *sfp*<sup>+</sup>. Cela indique que la grande majorité des ARNm d'ATCC 6633 ont bien été rétro-transcrits et que les ADNc marqués se sont ensuite correctement hybridés. Cette étude permet par conséquent d'envisager une approche en transcriptomique de la souche *B. subtilis* ATCC 6633 avec la puce EGT 168. Une attention particulière devra cependant être portée aux résultats issus du traitement des données concernant le gène *sbo* en raison de la saturation possible du signal pour les spots correspondant à ce gène.

### 4.3. APPORTS DE LA TRANSCRIPTOMIQUE

Le transcriptome se définit comme l'ensemble des ARN<sub>m</sub> présents dans un type cellulaire donné à un moment donné et dans une condition biologique précise. L'étude de cette population de transcrits offre la possibilité d'identifier les gènes impliqués dans une réponse métabolique globale. L'identification est faite en mettant en évidence des niveaux de transcription différentiels pour une liste de gènes entre deux conditions biologiques particulières. Ces gènes peuvent être impliqués de façon séquentielle dans des voies métaboliques particulières mettant en évidence l'importance de ces voies dans la réponse globale de la cellule. Ils peuvent aussi coder pour des protéines de régulation intervenant directement dans les mécanismes de régulation de ces voies métaboliques.

La contribution de la transcriptomique dans notre cas sera d'établir une liste de gènes exprimés différemment entre deux conditions expérimentales, l'une témoin et l'autre permettant l'obtention sélective de mycosubtiline *anteisoC-17*.

#### 4.3.1. GENES REGULES LORS DE LA SYNTHÈSE DE MYCOSUBTILINE ANTEISOC-17

##### 4.3.1.1. REGULATION PRECOCE

La phase préparatoire à l'étude en transcriptomique a permis de définir un ensemble de conditions environnementales permettant l'obtention quantitative et aussi sélective de mycosubtiline *anteisoC-17*. En effet, les résultats issus de l'étude physiologique présentés au § 3.3. ont montré que la production de mycosubtiline pouvait être augmentée en utilisant le milieu de Landy tamponné par du MOPS 100 mM à pH 7,0 Cette condition a aussi permis de limiter la synthèse de surfactine. Les expériences présentées au § 3.4. ont ensuite montré qu'en présence d'isoleucine, la production de mycosubtiline par les souches ATCC 6633 et BBG100 pouvait être orientée vers l'isoforme *anteisoC-17*. Pour finir, la perte de productivité observée après le retrait de l'extrait de levure du milieu de Landy (§ 4.2.1.) a pu être limitée par la possibilité de réaliser les cultures dans des conditions de fortes limitations en oxygène (§ 3.7.4).

Afin de garantir un phénotype [mycosubtiline *anteisoC-17*<sup>+++</sup>], le choix a été fait d'étudier préférentiellement la réponse transcriptomique de la souche BBG100 qui garantit un

niveau de production de mycosubtiline entre 10 et 15 fois supérieur à celui d'ATCC 6633. Des cultures de *B. subtilis* BBG100 ont par conséquent été réalisées dans 100 mL de milieu de Landy modifié, tamponné avec du MOPS 100 mM pH 7,0, additionné de 2 g/L d'isoleucine (essai) ou non (témoin).

Les prélèvements réalisés sur les cultures en vue de l'étude du transcriptome sont réalisés de façon précoce (figure 53) afin d'accéder aux informations sur les régulations géniques apparaissant en début de croissance.

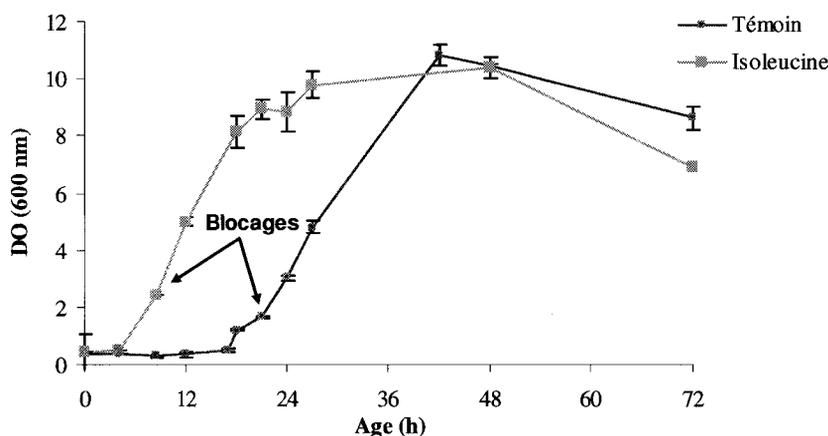


Figure 53 : Evolution moyenne de la DO à 600 nm lors de cultures de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié tamponné par du MOPS 100 mM pH 7,0 additionné d'isoleucine à 2 g/L ou non. La moyenne est calculée sur les résultats obtenus à partir de trois cultures inoculées à des niveaux de biomasse identiques. Les flèches indiquent les temps des blocages du transcriptome réalisés sur une des cultures du triplicat.

Un blocage réalisé selon le protocole décrit au § 2.4.2.1. de façon précoce, ici lorsque le nombre de générations est de 2,4 DO pour la condition essai et de 1,4 DO pour la condition témoin se caractérise aussi par une extractibilité facilitée des ARNs, les cellules étant manifestement plus facilement lysées, et par une distribution des individus au sein de la population bactérienne plus homogène. Cette dernière caractéristique s'observe aisément au microscope : les *Bacilles* ont à ce stade une petite taille ainsi qu'une mobilité accrue. Il est difficile d'établir une relation entre la morphologie et l'état métabolique de *B. subtilis* ATCC

6633 mais il est vraisemblable qu'une population morphologiquement homogène correspondra à un état métabolique mieux défini que celui d'une population hétérogène. Comme annoncé au § 4.2.1., l'absence d'extrait de levure a un effet important sur la croissance bactérienne puisqu'un allongement de la phase de latence est observé, en particulier pour la condition témoin où la seule source d'azote est le sulfate d'ammonium à 2,3 g/L.

Une séquence d'opérations de traitement des cellules issues de la condition témoin et de l'essai est ensuite lancée : extraction des ARNs, contrôle de la quantité et de la qualité des ARNs, transcription inverse et marquage des ARNs par Cy3 et Cy5, hybridation sonde/cibles, lecture au scanner et prétraitement de l'image scannée avec le logiciel Genepix. Le traitement des données sous Midas, décrit au § 2.5.4., et sous Excel, détaillé au § 2.5.5., est présenté dans l'annexe 5. Une liste d'une centaine de gènes qui présentent un taux d'expression significativement différent entre les deux conditions testées est proposée dans la figure 54.

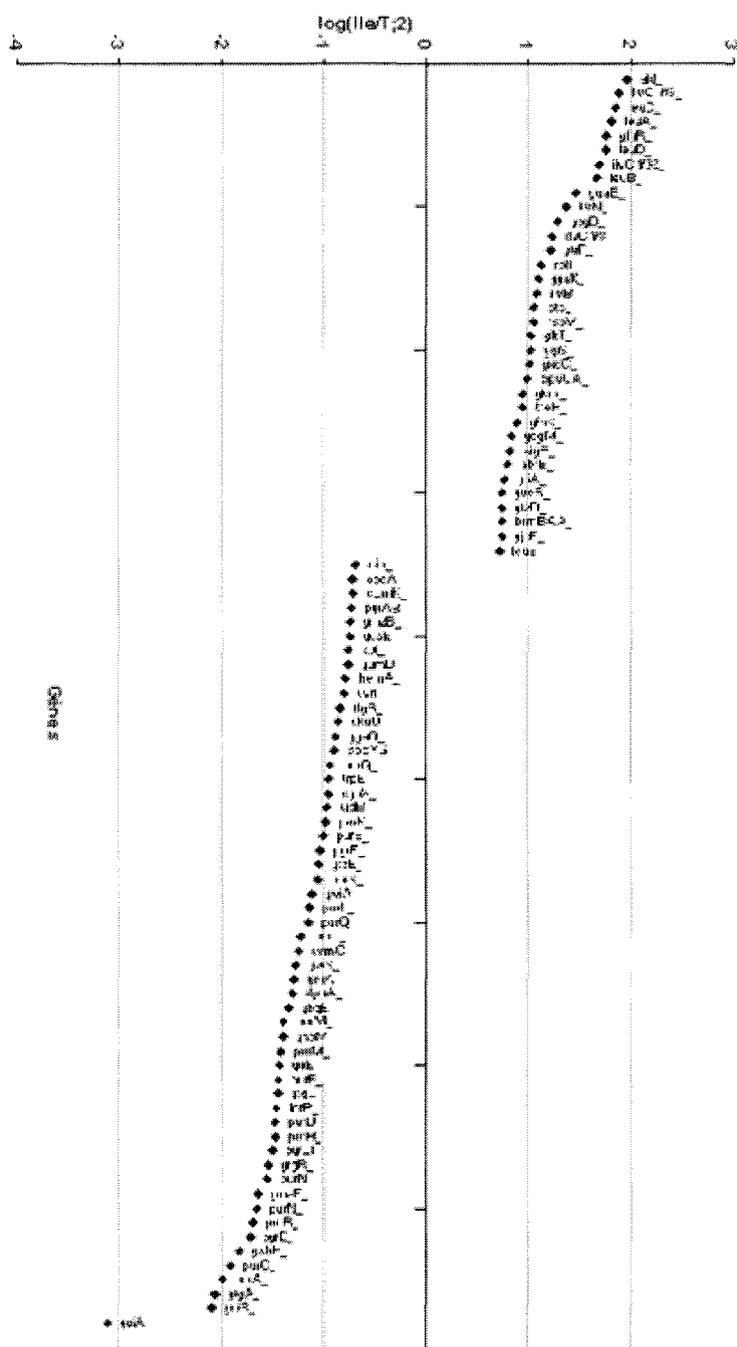


Figure 54 : Rapports d'expression (logarithme base 2) des gènes de la condition additionnée d'isoleucine comparée à la condition témoin. Chaque gène est analysé en quadruplat. Les échantillons étudiés correspondent à des prélèvements réalisés après trois générations.

La liste des principales voies métaboliques d'appartenance des gènes listés sur la figure 54 est donnée dans le tableau 25. Cette liste est établie par recoupement des données d'expression obtenues grâce aux puces à ADN avec la base de données métaboliques de KEGG.

Tableau 25 : Liste des gènes exprimés différemment entre la condition « essai » additionnée d'isoleucine à 2 g/L et la condition « témoin ». Le ratio d'expression et la fonction assignée sont précisés pour chaque gène.

Voie métabolique d'appartenance du gène	Ratio des transcripts MSM+Ile / MSM	Fonction assignée
<b>Métabolisme des purines</b>		
<i>purA</i>	0,25	adénylosuccinate synthétase (IMP--aspartate ligase)
<i>guaB</i>	2,75	inosine-5'-monophosphate dehydrogénase
<i>purE</i>	0,50	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase I
<i>purK</i>	0,51	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase II
<i>purB</i>	0,31	adénylosuccinate lyase
<i>purC</i>	0,26	phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthétase
<i>purL</i>	0,46	phosphoribosylformylglycinamide synthase II
<i>purQ</i>	0,45	phosphoribosylformylglycinamide synthase I
<i>purF</i>	0,37	phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase
<i>purM</i>	0,38	phosphoribosylaminoimidazole synthétase
<i>purN</i>	0,32	phosphoribosylglycinamide formyltransférase
<i>purH</i>	0,36	phosphoribosylaminoimidazole carboxy formyl formyltransférase
<i>purD</i>	0,36	phosphoribosylglycinamide synthétase
<i>nrdE</i>	1,61	ribonucleoside-diphosphate réductase alpha chain
<b>Transporteurs ABC</b>		
<i>dppA</i>	0,41	D-alanyl-aminopeptidase
<i>dppB</i>	0,66	dipeptide transport system perméase protein
<i>yxeB</i>	1,53	putative ferrichrome transport system substrate-binding protein
<i>yvcR</i>	1,68	ABC transport system ATP-binding protein
<i>opuCA</i>	1,98	glycine bétaine/carnitine/choline transport system ATP-binding protein
<i>ytgA</i>	0,24	manganèse transport system substrate-binding protein
<i>ytgB</i>	0,35	manganèse transport system ATP-binding protein
<i>ytgC</i>	0,37	manganèse transport system permease protein
<i>ytgD</i>	0,67	manganèse transport system permease protein
<i>ytrF</i>	2,33	similaire à une protéine hypothétique

**Biosynthèse de valine, leucine et isoleucine**

<i>ilvB</i>	2,13	acétolactate synthase grande sous-unité
<i>ilvN</i>	2,58	acétolactate synthase petite sous-unité
<i>ilvC</i>	3,67	cétol-acide reductoisomérase
<i>leuB</i>	3,16	3-isopropylmalate déhydrogenase
<i>leuS</i>	1,65	leucyl-tRNA synthétase
<i>leuA</i>	3,49	2-isopropylmalate synthase
<i>leuC</i>	3,61	3-isopropylmalate déhydratase grande sous-unité
<i>leuD</i>	3,36	3-isopropylmalate déhydratase petite sous-unité
<i>ybgE</i>	0,40	aminotransférase des acides aminés branchés

**Métabolisme des pyrimidines**

<i>pyrAB</i>	0,61	carbamoyl-phosphate synthase grande sous-unité
<i>pyrF</i>	0,49	orotidine 5'-phosphate décarboxylase
<i>pyrE</i>	0,30	orotate phosphoribosyltransférase
<i>nrdE</i>	1,61	ribonucléoside-diphosphate réductase chaîne alpha

**Biosynthèse de pantothenate et de CoA**

<i>ilvB</i>	2,13	acétolactate synthase grande sous-unité
<i>ilvN</i>	2,58	acétolactate synthase petite sous-unité
<i>ilvC</i>	3,67	céto-acide réductoisomérase
<i>ybgE</i>	0,40	aminotransférase des acides aminés branchés

**Ribosome**

<i>ctc 50S</i>	2,08	protéine ribosomale L25, protéine générale de stress
<i>ytiA</i>	1,71	grande sous-unité de la protéine ribosomale L31

**Métabolisme du glutamate**

<i>purF</i>	0,37	phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase
<i>pyrAB</i>	0,61	carbamoyl-phosphate synthase grande sous-unité

**Métabolisme de l'alanine et de l'aspartate**

<i>purA</i>	1,55	adénylosuccinate synthétase (IMP--aspartate ligase)
<i>purB</i>	0,61	adénylosuccinate lyase

**Métabolisme du pyruvate**

<i>ackA</i>	1,55	acétate kinase
<i>leuA</i>	3,49	2-isopropylmalate synthase

**Métabolisme du butanoate**

<i>ilvB</i>	2,13	acétolactate synthase grande sous-unité
<i>ilvN</i>	2,58	acétolactate synthase petite sous-unité

**Dégradation de la valine, leucine et de l'isoleucine**

<i>ybgE</i>	0,40	aminotransférase des acides aminés branchés
-------------	------	---

**Régulateurs**

<i>abrB</i>	1,74	régulateur de la transcription
<i>comK</i>	0,61	facteur de compétence
<i>codY</i>	0,80	régulateur de la transcription

L'étude des résultats présentés dans le tableau 25 révèle que :

- un seul gène, *ybgE* [EC:2.6.1.42], est impliqué dans le métabolisme de dégradation de la valine, la leucine et l'isoleucine.
- neuf gènes appartiennent aux voies métaboliques de la synthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine : *ilvB* [EC:2.2.1.6], *ilvN* [EC:2.2.1.6], *ilvC* [EC:1.1.1.86], *leuB* [EC:1.1.1.85], *leuS* [EC:6.1.1.4], *leuA* [EC:2.3.3.13], *leuC* [EC:4.2.1.33], *leuD* [EC:4.2.1.33]. Les gènes *ilvB*, *ilvN*, *ilvC*, *leuA*, *leuB*, *leuC* et *leuD* appartiennent à un même opéron. Le gène *ybgE* [EC:2.6.1.42] est présent aussi : il intervient à la fois dans les voies de biosynthèse et de dégradation des acides aminés branchés.
- deux gènes sont impliqués dans le métabolisme du pyruvate, *ackA* codant pour l'acétate kinase [EC:2.7.2.1] et *leuA* codant pour la 2-isopropylmalate synthase [EC:2.3.3.13].
- deux gènes impliqués dans le métabolisme de l'aspartate sont réprimés, *purA* codant pour l'adénylosuccinate synthétase [EC:6.3.4.4] et *purB* codant pour l'adénylosuccinate lyase [EC:4.3.2.2].
- deux gènes permettant l'entrée dans le métabolisme des purines et des pyrimidines sont réprimés en présence d'isoleucine : *purF* codant pour la phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase [EC:2.4.2.14] et *pyrAB* codant pour la carbamoyl-phosphate synthase [EC:6.3.5.5].
- 14 gènes appartiennent aux voies métaboliques des purines : *purA* [EC:6.3.4.4], *guaB* [EC:1.1.1.205], *purE* [EC:4.3.2.2], *purK* [EC:4.1.1.21], *purB* [EC:4.1.1.21], *purC*

[EC:6.3.2.6], *purL* [EC:6.3.5.3], *purQ* [EC:6.3.5.3], *purF* [EC:2.4.2.14], *purM* [EC:6.3.3.1], *purN* [EC:2.1.2.2], *purH* [EC:2.1.2.3], *purD* [EC:6.3.4.13] et *nrdE* [EC:1.17.4.1],

- quatre gènes appartiennent aux voies métaboliques des pyrimidines : *pyrAB* [EC:6.3.5.5], *pyrF* [EC:4.1.1.23], *pyrE* [EC:2.4.2.10] et *nrdE* [EC:1.17.4.1]

- 10 appartiennent aux voies métaboliques des transporteurs ABC : *dppA*, *dppB*, *yxvB*, *ycvR*; *opuCA*, *ytgA*, *ytgB*; *ytgC*, *ytgD* et *yrF*,

Le rôle des enzymes qui correspondent aux gènes régulés en présence d'isoleucine est discuté en s'appuyant sur les schémas des grandes voies métaboliques présentes chez *B. subtilis* (source KEGG).

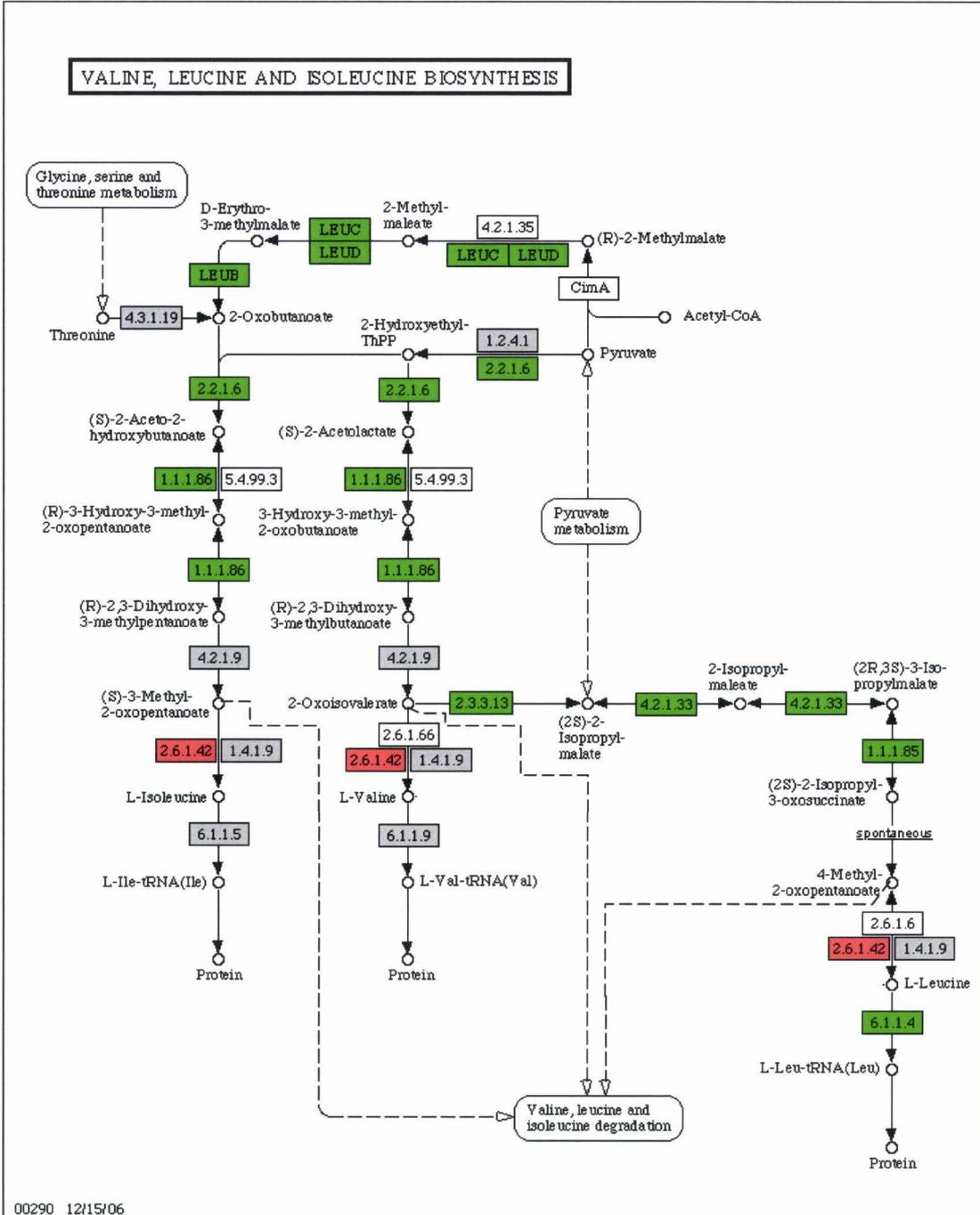


Figure 55 : Voies métaboliques de la biosynthèse des acides aminés branchés chez *B. subtilis*. Les gènes régulés en présence d'isoleucine correspondent aux cases rouges (répression) ou vertes (sur-expression). Les cases grisées correspondent à des gènes non régulés ; les cases blanches à des gènes inexistant chez *B. subtilis*.

La figure 55 montre que l'ajout d'isoleucine réprime le gène *ybgE* [EC:2.6.1.42]. Le gène *ybgE* code pour une aminotransférase commune aux 3 acides aminés branchés et nécessaire à leur synthèse. La répression du gène *ybgE* pourrait avoir comme conséquence de limiter la synthèse de L-leucine et de L-valine. L'opéron *ilvBNCleuABCD* pourrait être sur-exprimé afin de contre-balancer l'effet d'une répression de *ybgE*. Le gène *leuS* pourrait être sur-exprimé afin de favoriser l'incorporation de la leucine au niveau du ribosome. La croissance du micro-organisme étant normale en présence d'isoleucine (figure 53), il est plausible que la sur-expression d'*ilvBNCleuABCD* et du gène *leuS* contrebalance de manière efficace la répression de *ybgE*.

L'enzyme codée par le gène *ybgE* est aussi impliqué dans le métabolisme de la dégradation de la valine, la leucine et de l'isoleucine (figure 56) sans différence de spécificité vis à vis de ces substrats amino-acides branchés. En effet, YbgE présente des caractéristiques enzymatiques vis à vis de Val, Leu et Ile équivalentes, avec des valeurs de  $K_m$  proches de 3  $\mu\text{M}$  et de  $V_{max}$  proches de 15  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine (Berger *et al.*, 2003). Il est à noter que le gène *ywaA*, isologue de *ybgE* et qui forme un tandem *ywaA ybgE* (Thomaides *et al.*, 2007), n'est pas réprimé en présence d'isoleucine. Selon Berger *et al.* (2003) YwaA présente des valeurs de  $K_m$  qui sont proches de celles de YbgE. En revanche, YwaA présente des valeurs de  $V_{max}$  proches de 0,1  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine bien inférieures à celles de YbgE qui limite fortement l'effet d'une régulation du gène *ywaA*.

Des études ont été menées sur la régulation de l'expression des gènes (Mader *et al.*, 2002), et particulièrement sur celle de *codY*, codant pour le répresseur pléiotropique CodY, dans des conditions de disponibilité en acides aminés variables (Molle *et al.*, 2003). Ces expériences sont menées avec comme source carbonée du glucose et comme source azotée de la glutamine. L'ajout d'un mélange de 16 acides aminés, parmi lesquelles l'isoleucine, a été testé. Elles ont permis d'identifier que les gènes *ilvB* et *ybgE* sont les cibles du régulateur de la transcription CodY, qui agit comme un répresseur.

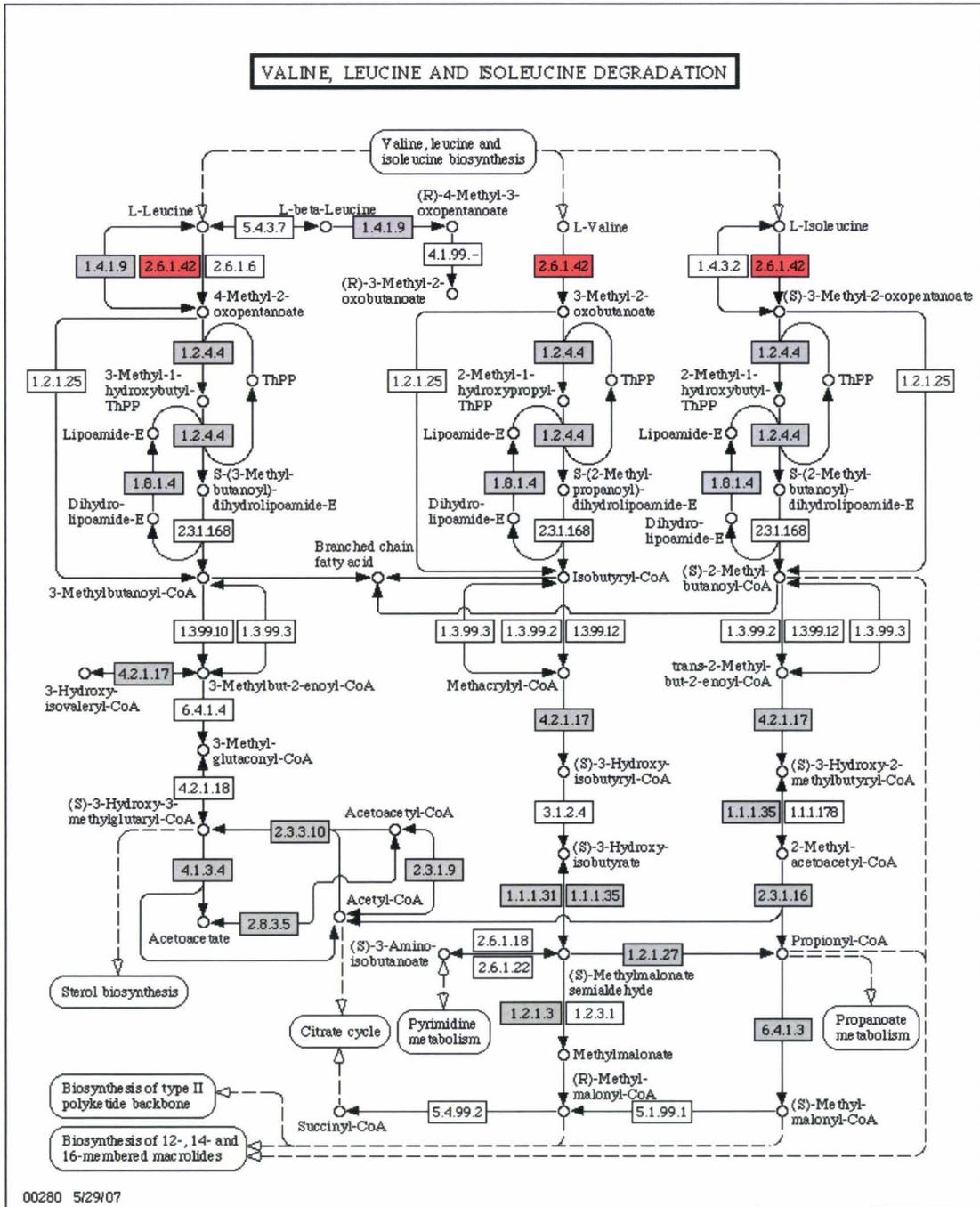


Figure 56 : Voies métaboliques de la dégradation des acides aminés branchés chez *B. subtilis*. Les gènes réprimés en présence d'isoleucine correspondent aux cases rouges. Les cases grisées correspondent à des gènes non régulés ; les cases blanches à des gènes inexistant chez *B. subtilis*.

Dans notre cas le gène *codY* n'apparaît pas dans la liste des gènes présentés dans la figure 54, cependant les résultats obtenus après traitement des données des puces par la méthode du bootstrap suivi d'une analyse de la variance (ANOVA), réalisé dans le cadre d'une collaboration avec la Plateforme de Génomique Fonctionnelle de Lille, ont montré que le gène *codY* était sensiblement réprimé en présence d'isoleucine, avec un ratio logarithmique en base 2 de -0,3. En se référant aux résultats de Molle *et al.*, 2003, la sur-expression du gène *ilvB* obtenue dans le cadre de nos travaux apparaît comme normale lorsque *codY* est réprimé. En revanche, si l'on se fie aux résultats de Molle *et al.*, 2003, le gène *ybgE* aurait aussi du être sur-exprimé lorsque *codY* est réprimé, ce qui n'est pas le cas dans nos expériences. L'originalité de ce résultat s'explique probablement par la différence entre *B. subtilis* 168, souche étudiée par Molle *et al.*, et *B. subtilis* ATCC 6633. De plus, les cultures témoins réalisées par Molle *et al.* en vue d'étudier l'effet sur le transcriptome d'un cocktail de 16 acides aminés sont faites sur milieu minimum additionné de glutamine. Dans notre cas, les cultures témoins réalisées afin d'étudier l'effet sur le transcriptome de l'isoleucine sont faites sur le milieu de Landy modifié.

Même si cette régulation atypique de *ybgE* reste difficilement interprétable sans données supplémentaires, expérimentales et bibliographiques, on peut envisager de discuter l'hypothèse du rôle du gène *ybgE* dans le phénotype [mycosubtiline *anteisoC-17<sup>+++</sup>*]. Nous l'avons vu, la croissance du micro-organisme étant normale en présence d'isoleucine (figure 53), l'effet de la répression de *ybgE* sur la synthèse des acides aminés branchés est contrebalancé par la sur-expression de l'opéron *ilvBNCluABCD*, codant pour des enzymes intervenant en amont de YbgE. La biosynthèse des acides aminés branchés s'effectue correctement mais le pool de précurseurs de la valine, le 2-oxoisovalérate, et de la leucine, le 4-méthyl 2-oxopentanoate, pourrait être limité. Les gènes intervenant dans la voie de dégradation du 2-oxoisovalérate et du 4-méthyl 2-oxopentanoate n'étant pas sur-exprimés, le pool d'isobutyryl-CoA et de 3-méthyl butanoyl-CoA pourrait aussi être limité. On sait par ailleurs que l'isobutyryl-CoA est le précurseur des acides gras branchés pairs de type *iso* et le 3-méthyl butanoyl-CoA celui des acides gras branchés impairs de type *iso*. Par conséquent, le pool d'acides gras branchés pairs ou impairs de type *iso* pouvant être limité, cela expliquerait l'absence totale d'isoformes de mycosubtilines de type *iso* synthétisée lors de cultures réalisées en présence d'isoleucine. En revanche, bien que le gène *ybgE* soit réprimé, l'ajout

d'isoleucine forcerait la formation du précurseur (S)-2-méthyl-butanoyl-CoA des acides gras branchés impairs de type *anteiso*, ce qui expliquerait la prépondérance de l'isoforme *anteiso* de la mycosubtiline dans ces conditions de culture.

Une autre cible du répresseur CodY est le gène *bkd* (Debarbouillé *et al.*, 1999) impliqué dans la régulation d'enzymes de la voie de dégradation des acides aminés branchés, parmi lesquelles BfmBAA. Nos résultats montrent qu'en présence d'isoleucine, le gène *bfmBAA* est sur-exprimé. La sous-expression obtenue pour le gène *codY* qui code pour le répresseur de *bkd*, lui-même codant pour le répresseur du gène *bfmBAA* constitue une cascade de régulation conforme à ce qui a été démontré par des travaux antérieurs (Debarbouillé *et al.*, 1999).

Un résultat notable est la sur-expression du gène *abrB* qui code pour un facteur de transcription qui intervient dans la régulation des phases de transition de *B. subtilis*. Il a été montré qu'AbrB se lie au promoteur du gène *comK* afin de réprimer son expression (Hamoen *et al.*, 2003). Une sur-expression d'*abrB* se traduit classiquement par conséquent par la répression de *comK*. Il est utile de préciser que le facteur de compétence ComK est le principal responsable de l'initiation de la phase de compétence chez *Bacillus*. Une conséquence de l'entrée en phase de compétence est le blocage de la réplication de l'ADN et l'arrêt des divisions cellulaires.

Les résultats issus du traitement des données montrent qu'en présence d'isoleucine, la sur-expression d'*abrB* est combinée à la répression de *comK*. Ce résultat est conforme aux résultats mettant en évidence la liaison de AbrB en position -35 du promoteur de *comK* (Hamoen *et al.*, 2003). Ce résultat est aussi conforme aux résultats publiés par (Mader *et al.*, 2002) obtenus en présence de casamino-acides. En revanche, la sous-expression concomitante du gène *codY* est plus difficile à expliquer. En effet, Cod Y et AbrB agissent normalement de concert pour réprimer l'expression de *comK*. Là encore, nos résultats suggèrent un mécanisme complexe de la régulation ayant lieu chez ATCC 6633 lors de cultures en présence d'isoleucine visant à favoriser la synthèse de mycosubtiline *anteisoC-17*.

Des auteurs ont montré le rôle potentiel d'AbrB dans la régulation du gène *myc* chez ATCC 6633 (Duitman *et al.*, 2007). En effet, un mutant de *B. subtilis* ATCC 6633  $\Delta$ *abrB* a

permis d'augmenter par un facteur 5 l'expression du gène *myc* codant pour la mycosubtiline synthétase. Il semblerait que Duitman *et al.*, 2007 aient obtenu un mutant  $\Delta codY$  à partir d'ATCC 6633 mais aucun résultat n'est présenté pour ce mutant. Cette partie de leur travail est d'ailleurs considérée comme préliminaire par les auteurs car les réponses physiologiques du mutant  $\Delta abrB$  indiquent que plusieurs régulateurs de la transcription interviendraient dans la régulation de *myc*.

- deux gènes sont impliqués dans le métabolisme du pyruvate, *ackA* codant pour l'acétate kinase [EC:2.7.2.1] et *leuA* codant pour la 2-isopropylmalate synthase [EC:2.3.3.13]. La sur-expression de *leuA* (figure 57) a pour conséquence de pousser le métabolisme du pyruvate vers la synthèse de la leucine. L'effet de la répression du gène *ybgE* ayant pour conséquence de limiter la synthèse de leucine pourrait de ce fait être contrebalancé par la sur-expression de *leuA*. De plus, la sur-expression du gène *leuS* codant pour la leucyl-tRNA synthétase permettrait à la machine ribosomale de faciliter l'ajout de la leucine au niveau de la synthèse protéique.



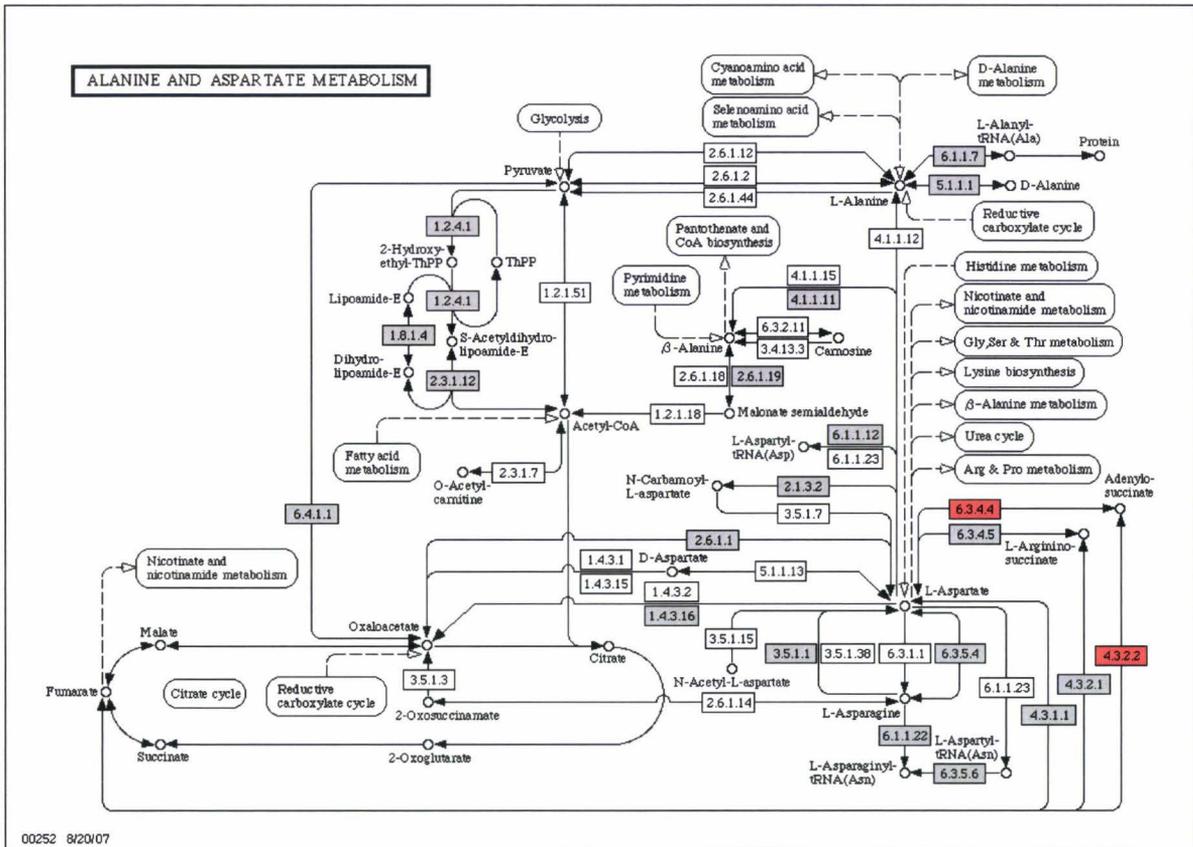


Figure 58 : Voies métaboliques de l'aspartate chez *B. subtilis*. Les gènes réprimés en présence d'isoleucine correspondent aux cases rouges. Les cases grisées correspondent à des gènes non régulés ; les cases blanches à des gènes inexistant chez *B. subtilis*.

Avec celles du glutamate, les voies métaboliques de l'aspartate peuvent être empruntées par *B. subtilis* pour la fourniture en azote via le relargage d'un ion  $\text{NH}_4^+$  par l'aspartate sous l'effet de la L-aspartase (figure 58). Comparée à la condition « essai », la condition témoin présente une carence en source azotée puisqu'aucun acide aminé n'est ajouté. La cellule pourrait utiliser la sur-expression de *purA* et *purB* pour favoriser la synthèse d'aspartate pour faire face à cette carence en azote.

Les gènes *purA*, *purE*, *purK*, *purB*, *purC*, *purL*, *purQ*, *purF*, *purM*, *purN*, *purH* et *purD* sont tous réprimés en présence d'isoleucine. Ce résultat est similaire à ce que Beckering *et al.* (2002) ont obtenu lors d'expériences de chocs froids réalisés sur *B. subtilis*

JH642. D'après Beckering et ses collègues, cette régulation serait due au ralentissement de la croissance observé après le choc froid. En effet, la fréquence des divisions cellulaires diminuant, les besoins de la cellule en nucléotides diminuent. Dans notre cas, les taux de croissance d'ATCC 6633 étant similaires dans les deux conditions au moment du blocage, il devient difficile d'expliquer ce phénomène en se référant aux hypothèses de Beckering *et al.* (2002).

Le gène *nrde* codant pour la ribonucleoside-diphosphate réductase est sur-exprimé en présence d'isoleucine. Ce gène a été identifié dans une souche de *B. subtilis* présentant une sensibilité à la température. Ce phénotype serait lié à une auxotrophie déoxyribonucléotidique (Bazill et Karamata, 1972). De plus, une étude récente rapporte que *nrde* serait essentiel à une croissance aérobie ou anaérobie (Hartig *et al.*, 2006). Le gène *nrde* serait donc impliqué dans plusieurs mécanismes de régulation. Klein *et al.* (1999) ont montré que l'ajout d'isoleucine favorisait chez *B. subtilis* JH642 l'augmentation du pool d'acides gras branchés cryoprotecteurs (voir le paragraphe ci-après). Il serait intéressant de vérifier si la surexpression de ce gène n'est pas à mettre en relation avec cette réaction physiologique.

Il est à noter que deux gènes codant pour des protéines de fonction inconnues, YuiA et YuiB sont fortement réprimés en présence d'isoleucine. Des travaux ont montré que le gène *yuiC* est aussi réprimé en présence de casamino-acides (Mader *et al.*, 2002). La réponse des gènes *yui* semblant générique, il serait intéressant d'investiguer plus en avant le rôle des protéines correspondantes dans la régulation ayant lieu chez ATCC 6633 lors de cultures en présence d'isoleucine.

#### 4.3.1.2. REGULATION TARDIVE

La réponse transcriptomique de *B. subtilis* BBG100 a été étudiée à partir d'échantillons prélevés au début de la phase de ralentissement de la croissance. L'objectif de cette étude est d'accéder à l'information sur les niveaux d'expression des gènes transcrits tardivement lors d'une culture réalisée en présence d'isoleucine.

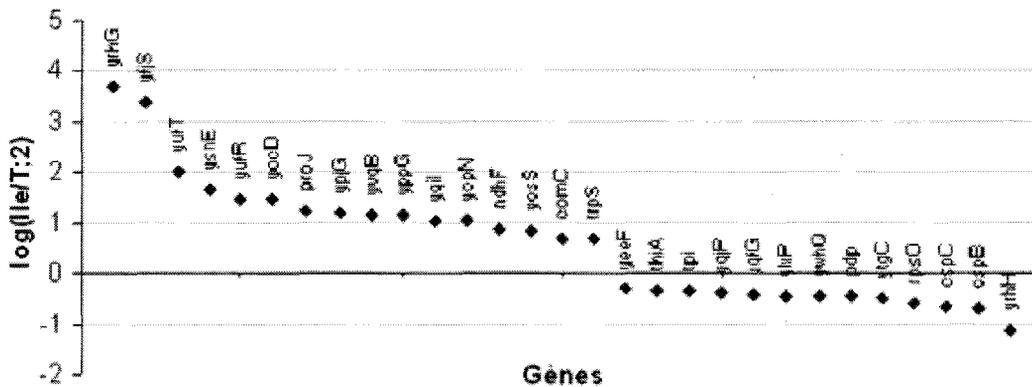


Figure 59 : Rapports d'expression des gènes exprimés en logarithme base 2 de la condition « essai » additionnée d'isoleucine comparée à la condition « témoin ». Les échantillons étudiés correspondent à des prélèvements réalisés après sept générations.

Les données transcriptomiques, obtenues à partir de puces à ADN réalisée en flip-dye, se sont révélées difficiles à traiter en raison de problèmes en cascade : rendements d'extraction en ARN faibles, qualité relativement médiocre des ARN, marquage insuffisant des cibles par les cyanines, quantité d'ADNc hybridée faible, bruit de fond élevé sur les puces réalisées en flip-dye, analyse des duplicats laborieuses. Les deux raisons principales expliquant ces difficultés sont liées à la lyse incomplète des cellules plus résistantes à ce stade de la croissance et à l'hétérogénéité de la population cellulaire.

Malgré tout, une liste de 29 gènes régulés différemment en présence d'isoleucine a été obtenue (figure 59). Une attention particulière a été portée aux gènes *cspB* et *cspC* qui sont réprimés en présence d'isoleucine. Ces gènes codent pour des protéines de choc thermique et sont généralement exprimés de façon tardive chez *B. subtilis* (Graumann et Marahiel, 1999).

Klein et al. (1999) ont montré que l'apport d'isoleucine dans le milieu permettait à la souche *B. subtilis* JH642 de survivre à un choc froid en modifiant la fluidité membranaire par la formation d'acides gras branchés de type *anteiso*C-15 et C-17 au détriment d'acides gras *iso*C-15 et C-17. Ils ont également montré que la souche *B. subtilis* 168 était capable de

survivre à de telles conditions en modifiant la constitution de sa membrane de la même manière, et ce sans apport d'isoleucine.

On peut alors penser qu'un mécanisme stimulé lors d'un choc thermique pourrait, chez la souche *B. subtilis* 168, intervenir dans la génération de précurseurs orientant vers la formation d'acides gras branchés de type *anteiso*. Cette hypothèse se confirmerait chez ATCC 6633 si l'on supposait que cette souche, ou son dérivé BBG100, résistent de la même façon que *B. subtilis* 168 face à un choc thermique.

Dans nos expériences, lorsque l'on cultive cette bactérie avec un apport d'isoleucine, les gènes *cspB* et *cspC* sont réprimés. L'apport d'isoleucine qui joue un rôle cryoprotecteur se substituerait donc à ce mécanisme encore inconnu qui favorise la formation d'acides gras branchés de type *anteiso*. Ce mécanisme pourrait par la suite remplacer l'apport d'isoleucine en favorisant la formation d'acides gras branchés de type *anteiso*.

#### 4.3.2. EN BREF

L'ajout d'isoleucine dans le milieu de culture oriente sélectivement la synthèse de mycosubtiline vers l'isoforme *anteisoC*-17 très probablement en augmentant le pool d'acides gras branché *anteiso*. Les mécanismes mis en évidence grâce à l'étude en transcriptomique rendent compte de la complexité de la régulation opérant chez *B. subtilis* BBG100 lors des cultures en présence d'isoleucine. Par hypothèse, la répression du gène *ybgE* aurait pour effet de limiter la synthèse des acides aminés branchés et de limiter le pool d'acide gras branchés de type *iso* au profit d'acide gras branchés *anteiso*. La cellule semble limiter l'effet de la répression de *ybgE* sur la biosynthèse de Val et Leu en sur-exprimant *leuS*, *bfmBAA* ainsi que l'opéron *ilvBNClouABCD*. Le répresseur pléiotropique de la transcription CodY joue apparemment un rôle important dans la régulation de ce mécanisme. Le régulateur AbrB et le facteur de compétence ComK semblent aussi impliqués. Un autre type de mécanisme permettant l'augmentation du pool d'acides gras branchés *anteiso* serait lié aux gènes *cspB* et *cspC*.

#### 4.4. ETUDE PRELIMINAIRE DU ROLE DE REGULATEUR DE *CSPB* CHEZ ATCC 6633

##### 4.4.1. HOMOLOGIE DE *CSPB* ENTRE *B. SUBTILIS* ATCC 6633 ET 168

La première étape de ce travail a consisté à obtenir la séquence de *cspB* encore inconnue chez ATCC 6633. L'intégration du fragment dans le plasmide pGEM-T Easy puis la transformation d'*E. coli* JM109 selon la méthodologie utilisée au § 4.2.2.2 et décrite au § 2.3.4. suivi d'une extraction de l'ADN plasmidique a permis de récupérer une quantité suffisante de matériel nucléotidique pour le séquençage (Eurogentec). La seconde étape a consisté à aligner les séquences de *cspB* de *B. subtilis* ATCC 6633 et 168.

Features in this part of subject sequence:  
major cold-shock protein

Score = 641 bits (347), Expect = 0.0  
Identities = 347/347 (Leclère et al., 2005), Gaps = 0/347 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      GAAGATTACTGGTAGAGTAAAGGTAATTATTTTTGTTTCTGAACTATCTTTAAGAAGAAAGT
60
          |||
Sbjct 983945  GAAGATTACTGGTAGAGTAAAGGTAATTATTTTTGTTTCTGAACTATCTTTAAGAAGAAAGT
983886

Query 61     TTTGTAAGAGTTTTTCGTCTTGAAAGTTTGTTAAGAGCAAGAATAGTGAATTTAAGCGTTA
120
          |||
Sbjct 983885  TTTGTAAGAGTTTTTCGTCTTGAAAGTTTGTTAAGAGCAAGAATAGTGAATTTAAGCGTTA
983826

Query 121    TGATCGCTTTAGGAGGAAATTCATGTTAGAAGGTAAAGTAAAATGGTTCAACTCTGAAA
180
          |||
Sbjct 983825  TGATCGCTTTAGGAGGAAATTCATGTTAGAAGGTAAAGTAAAATGGTTCAACTCTGAAA
983766

Query 181    AAGGTTTCGGATTCATCGAAGTAGAAGGTCAAGACGATGTATTCGTTTCAATTTCTCTGCTA
240
          |||
Sbjct 983765  AAGGTTTCGGATTCATCGAAGTAGAAGGTCAAGACGATGTATTCGTTTCAATTTCTCTGCTA
983706

Query 241    TTCAAGGCGAAGGCTTCAAACTTTAGAAGAAGGCCAAGCTGTTTCTTTGAAATCGTTG
300
          |||
Sbjct 983705  TTCAAGGCGAAGGCTTCAAACTTTAGAAGAAGGCCAAGCTGTTTCTTTGAAATCGTTG
983646

Query 301    AAGGAAACCGCGGACCACAAGCTGCTAACGTTACTAAAGAAGCGTAA 347
          |||
Sbjct 983645  AAGGAAACCGCGGACCACAAGCTGCTAACGTTACTAAAGAAGCGTAA 983599
    
```

L'alignement révèle une homologie de séquence égale à 100%. L'identité des séquences des deux gènes pourrait donc être révélatrice d'une conservation de la fonction des CspB entre les deux souches. Cet élément appuierait l'hypothèse d'un rôle de CspB dans la régulation des voies métaboliques des acides aminés branchés chez ATCC 6633 et constituerait un premier élément de confirmation des résultats obtenus en transcriptomique.

#### 4.4.2. CRYORESISTANCE D'ATCC 6633

Pour les raisons évoquées au § 4.4.1., la cryosensibilité de *B. subtilis* ATCC 6633 et de son dérivé BBG100 a été étudiée en réalisant des cultures en fioles RAMOS selon le protocole décrit au § 2.6.4. Les résultats sont présentés sur la figure 60.

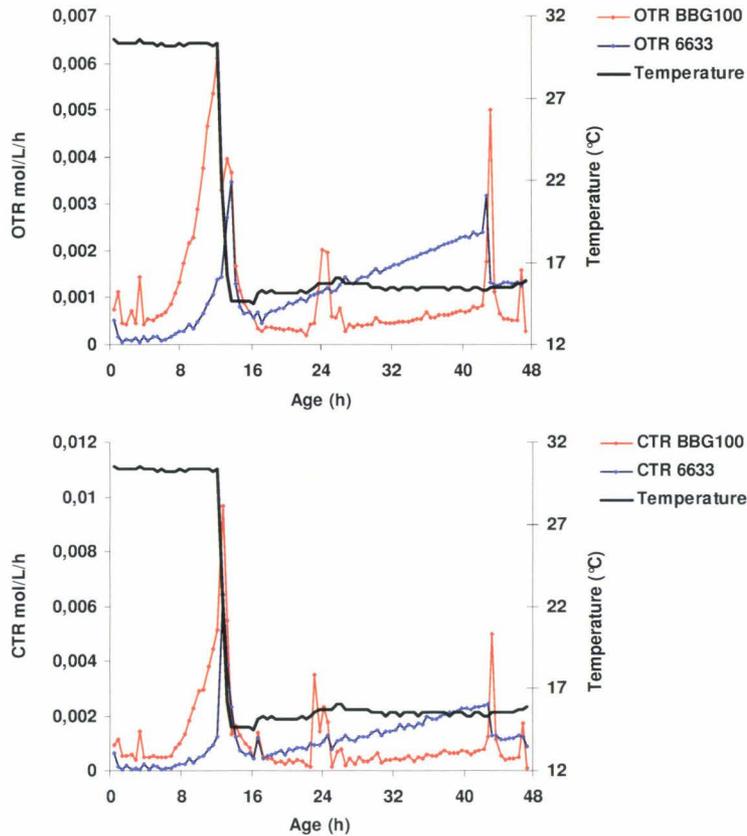


Figure 60 : Evolution de la température (°C), des vitesses de transfert en oxygène (OTR) et en CO<sub>2</sub> (CTR), exprimées en mol/L/h, lors de cultures de *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 sur milieu de Landy modifié, additionné de MOPS 100 mM, pH 7,0 et de 2 g/L d'acide glutamique

L'expérience de choc froid a été réalisée en basculant la température d'incubation de 30 à 15°C durant des cultures en fioles RAMOS de *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100. Pour chacune des souches, les cinétiques d'évolution du CTR sont légèrement plus importantes que celles de l'OTR révélant un QR supérieur à 1 caractéristique d'une production d'acides organiques déjà caractérisée au § 3.7.3.1. On observe une période de latence due à l'absence de l'extrait de levure dans le milieu pour les deux souches. Celle-ci semble plus marquée pour ATCC 6633, phénomène déjà observé au § 3.7.4.1. La croissance s'accompagne d'une augmentation de l'OTR et du CTR suivie d'une chute brutale au moment du déclenchement du choc froid à 16 h de culture.

Pour ATCC 6633, une augmentation linéaire de l'OTR de 0.5 à 2.5 mmol/L/h de 16 à 42 h est observée. Cette réponse indique qu'ATCC 6633 conserve une activité métabolique suite à un choc froid et peut donc survivre sans ajout d'acides aminés branchés. Ce comportement se rapproche de celui de 168. Il pourrait donc y avoir un mécanisme permettant d'augmenter la proportion d'acides gras branchés chez ATCC 6633.

Pour BBG100, une cryosensibilité plus élevée que pour ATCC 6633 est observée. Ce phénomène pourrait être explicable par une demande en acides gras branchés plus importante chez BBG100 en raison de la surproduction de mycosubtiline, particulièrement l'isoforme *anteisoC-17*. Il y aurait donc un phénomène de pompage vers la mycosubtiline synthétase d'une partie des acides gras cryoprotecteurs qui ne peuvent plus être intégrés à la membrane.

#### **4.4.3. VALIDATION PHYSIOLOGIQUE DU ROLE DE CSPB CHEZ ATCC 6633**

##### **4.4.3.1. EFFET DE LA TEMPERATURE**

Des cultures de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy modifié, additionné de MOPS 100 mM, pH 7,0, additionné d'acide glutamique à 2 g/L et sans extrait de levure ont été réalisées selon le protocole décrit au § 2.6.3. à différentes température : 20, 25, 30 et 37°C. Les productions de mycosubtilines à 24 h sont reportées dans la figure 61.

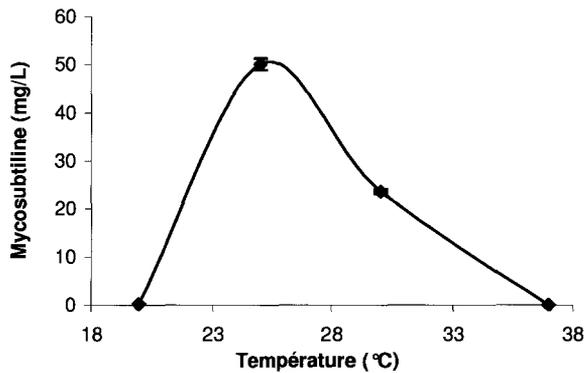


Figure 61 : Evolution de la concentration en mycosubtiline après 24 h de cultures réalisées à différentes température : 20, 25, 30 et 37°C de *B. subtilis* ATCC 6633 sur milieu de Landy modifié, additionné de MOPS 100 mM, pH 7,0, d'acide glutamique à 2 g/L et sans extrait de levure.

On observe que la production de mycosubtiline diminue avec la température. Dans notre expérience, la production est maximale à 25° et atteint 50 mg/L. La production quasi-nulle de 0,24 g/L obtenue à 20° est due à la quasi-absence de croissance de la souche à cette température. La production est nulle à 37°C. La figure 62 montre l'effet de la température sur le profil des isoformes produites.

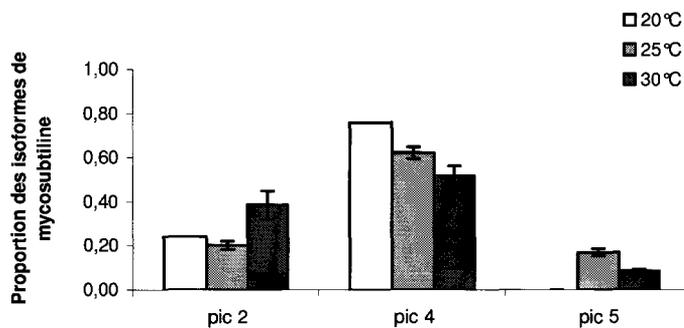


Figure 62 : Proportion des isoformes de mycosubtilines produites par *B. subtilis* ATCC 6633 lors de cultures réalisées à différentes température : 20, 25 et 30 sur milieu de Landy modifié, additionné de MOPS 100 mM, pH 7,0, d'acide glutamique à 2 g/L et sans extrait de levure. Les expériences à 25 et 30°C ont été réalisées en duplicat.

On remarque que la proportion de l'isoforme *anteisoC-17* augmente lorsque la température diminue. Cette réponse physiologique indique qu'ATCC 6633 a la capacité de modifier le profil des isoformes de mycosubtiline produite lorsque la température change. Il a été observé que *B. subtilis* modifiait son pool d'acide gras lorsque la température diminuait (Klein *et al.*, 1999) en augmentant la proportion d'acides gras branchés. D'autre part, il a été récemment démontré que l'activation de l'acyl puis le chargement de l'acyl-adénylate par le domaine AL de la mycosubtiline synthétase sur le thiolate du bras phosphopanthéinique du domaine ACPI n'était pas spécifique de la longueur de sa chaîne carbonée, lorsque celle-ci est comprise entre C-10 et C-16 (Hansen *et al.*, 2007). Ces deux observations physiologiques permettraient d'expliquer l'augmentation de la proportion de l'isoforme *anteisoC-17* lorsque la température diminue.

#### 4.4.3.2. DETERMINATION DU NIVEAU DE LA REGULATION

L'origine de la régulation permettant une augmentation de la proportion de l'isoforme *anteisoC-17* lorsque la température diminue pourrait être liée aux gènes *csp*, plus particulièrement au gène *cspB*. Des PCR comparatives ont été effectuées afin d'évaluer le taux d'expression *cspB*.

L'augmentation de la synthèse observée entre 30 et 20°C pourrait aussi indiquer une transcription plus importante du gène codant pour la mycosubtiline synthétase, *mycS*. Le niveau d'expression de *fenF*, appartenant à l'opéron *mycS* est donc été évalué par PCR comparative selon le protocole décrit au § 2.5.5. (figure 63). Les niveaux d'expression sont mis à l'échelle grâce au gène domestique de *B. subtilis*, *rpIL*, qui code pour la sous-unité ribosomale L12.

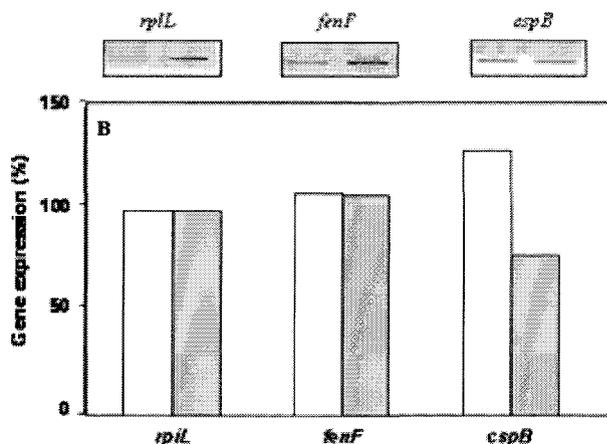


Figure 63 : Mesures des variations de l'expression des gènes *rplL*, *fenF* et *cspB* par PCR comparative lors de cultures *B. subtilis* ATCC 6633 réalisées à différentes température : 20 et 30°C sur milieu de Landy modifié, additionné de MOPS 100 mM, pH 7,0, d'acide glutamique à 2 g/L et sans extrait de levure.

Aucune véritable variation du taux d'expression de *fenF* n'est observée. Ce résultat indique que l'activité du promoteur *Pmyc* est constante pour une température comprise entre de 20 à 30°C. Par ailleurs, une expression plus importante du gène *cspB* est observée à basse température rendant compte de l'importance du rôle probable de *cspB* dans l'orientation de la synthèse des acides gras vers des composés à chaîne latérale.

#### 4.4.3.3. VALORISATION DES RESULTATS

L'effet de la température sur la production de mycosubtiline chez *B. subtilis* ATCC 6633 a été intégré à un ensemble de résultats plus large obtenus au laboratoire ProBioGEM par d'autres chercheurs et fait l'objet d'un manuscrit en préparation (voir annexe 4).

#### 4.5. CONCLUSION

L'optimisation du protocole de préparation des ARN d'ATCC 6633 a rendu possible la préparation des cibles pour l'étude en transcriptomique. La cible provenant d'ATCC 6633

hybridée sur la puce EGT 168 répondant de façon similaire à la cible provenant de 168 *sfp*<sup>+</sup> a permis d'envisager une étude en transcriptomique de la souche *B. subtilis* ATCC 6633 avec la puce EGT 168.

Les mécanismes de régulation mis en évidence grâce à l'analyse des résultats de transcriptomique rendent compte de la complexité de la régulation opérant chez ATCC 6633 lors des cultures en présence d'isoleucine. Cette condition expérimentale oriente sélectivement la synthèse de mycosubtiline vers l'isoforme *anteiso*C-17 très probablement en augmentant le pool d'acides gras branché *anteiso*.

Un gène candidat impliqué de façon précoce et centrale dans la sélectivité de cette réaction pourrait être *ybgE* dont la répression aurait pour double effet de limiter la synthèse des acides aminés branchés et de limiter le pool d'acide gras branchés de type *iso* au profit d'acide gras branchés *anteiso*. Afin d'assurer la prise en charge des acides aminés branchés par la machinerie ribosomale, la cellule semble pouvoir contre-balancer l'effet de la répression de *ybgE* en sur-exprimant *leuS*, *bfmBAA* ainsi que l'opéron *ilvBNClcuABCD*. Le répresseur pléiotropique de la transcription CodY jouerait un rôle dans la régulation de ce mécanisme, rendu plus complexe encore par l'implication du tandem de régulateurs AbrB/ComK.

Les gènes *cspB* et *cspC* codant pour des protéines de choc thermique froid, réprimés de façon tardive en présence d'isoleucine, pourraient eux aussi être impliqués dans l'augmentation du pool d'acides gras branchés *anteiso*.

Il a été montré que la souche *B. subtilis* ATCC 6633 semblait pouvoir résister à un choc froid. Un mécanisme encore inconnu permet donc d'augmenter la formation d'acides gras branchés de type *anteiso*. L'apport d'isoleucine se substituant à ce mécanisme a pour effet de réprimer les *csp* rendant compte de la participation des *csp* à ce mécanisme de régulation. Ce mécanisme pourrait par la suite remplacer l'apport d'isoleucine en favorisant la formation d'acides gras branchés de type *anteiso*.

CHAPITRE 5 : ETUDE DE LA PRODUCTION DE  
MYCOSUBTILINE PAR *B.SUBTILIS* EN  
BIOREACTEUR

## 5. ETUDE DE LA PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR *B.SUBTILIS* EN BIOREACTEUR

### 5.1. INTRODUCTION

L'extrapolation d'un procédé biologique de production de la mycosubtiline à l'échelle du bioréacteur aéré et à agitation mécanique est rendue compliquée à cause du moussage qui occasionne des pertes importantes de volume réactionnel. Ces débordements intempestifs et massifs sont dus aux propriétés tensioactives du composé.

Plusieurs techniques sont classiquement employées pour limiter le moussage : l'augmentation de la contre-pression appliquée à la cuve, l'utilisation de brise-mousses, de dévésiculateur, la diminution des conditions physiques du transfert en oxygène ou l'ajout de vecteurs d'oxygène, d'anti-mousses minéraux ou organiques. Une stratégie différente consiste à récupérer la mousse qui a débordé dans des collecteurs de fractions. Ce type de dispositif est refroidi afin de favoriser le retour à l'état liquide des mousses et ainsi limiter le volume de collecte. Ce processus a été employé par différents auteurs (Cooper *et al.*, 1981) (Neu et Poralla, 1990) et a permis l'extraction en continu des tensioactifs grâce au débordement de mousse. (Davis *et al.*, 2001) ont étudié l'effet de l'agitation sur la production de surfactine par *B. subtilis* et ont atteint un taux d'extraction de 100% mais avec comme contrepartie une perte élevée et non contrôlée de volume de culture. L'extraction en continu de la surfactine comporte l'avantage de faciliter la récupération du produit qui peut être laborieuse (Isa *et al.*, 2007) lorsqu'elle est réalisée à partir du moût de culture une fois la culture est achevée.

Le travail entrepris en bioréacteur présente dans un premier temps les avantages à travailler en mode discontinu classique, avec la possibilité de réguler le pH ou l'oxygène dissous, mais aussi les difficultés rencontrées à cause du moussage. Dans un deuxième temps, il s'attache à la mise au point d'un mode semi-discontinu débordant permettant de mieux maîtriser les pertes de volumes et de biomasse liées au moussage. Un modèle de croissance basé sur l'équation de Monod est établi afin d'estimer le taux de croissance spécifique moyen

du microorganisme lors de cultures en mode semi-discontinu débordant alimentées exponentiellement.

## 5.2. CULTURES DISCONTINUES

### 5.2.1. PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR *B. SUBTILIS* ATCC 6633

#### 5.2.1.1. CULTURE AVEC REGULATION DU PH

La souche ATCC 6633 est cultivée en mode discontinu selon le protocole décrit au § 2.6.6. sur milieu de Landy modifié et additionné d'acide glutamique à 2 g/L. Le pH est régulé à la valeur de 6,5. La durée de la culture est de 72 h. La figure 64 montre l'évolution des paramètres de la culture.

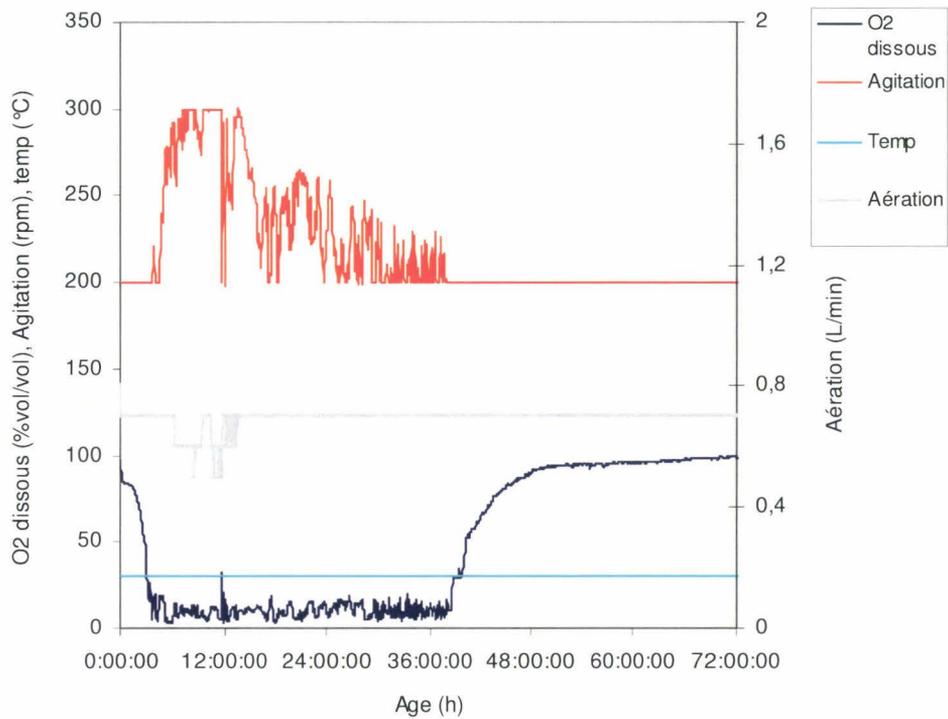


Figure 64 : Evolution de la concentration en oxygène dissous (%vol/vol de la saturation), de l'agitation (rpm), de la température (°C) et de l'aération (L/min) lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* ATCC 6633 en milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L, pH=6,5

La figure 64 montre une chute de la pression partielle en oxygène dissous 1 h environ après l'inoculation du milieu nutritif par ATCC 6633. Celle-ci est provoquée par l'augmentation de la demande volumique en oxygène du micro-organisme, elle-même liée au début de la croissance du microorganisme observée sur la figure 3. Après 4 h de culture, la concentration en oxygène dissous atteint 10% de la valeur à saturation ce qui déclenche une augmentation de l'agitation. La rampe d'agitation est réglée de sorte à ne pas chuter en dessous du seuil de 10% en oxygène dissous. Elle est bornée entre 200 et 300 rpm. Après 14 h de croissance, une diminution progressive de l'agitation est observable. Elle traduit une baisse de la demande volumique en oxygène et donc une activité respiratoire plus faible. Pourtant la concentration cellulaire augmente encore entre 14 et 24 h de culture, d'autres cultures avec un échantillonnage réalisé sur cet intervalle de temps permettent de l'affirmer. C'est le signe d'un basculement métabolique qui pourrait être le passage d'une source de substrat à une autre ou l'apparition d'une limitation ou d'une inhibition par l'un des constituants du milieu de culture. Cette hypothèse de basculement métabolique est confirmée par l'étude de l'évolution des pulses de titrants sur cet intervalle de temps (figure 65). La phase d'acidification du milieu caractérisée au § 3.3.1.1. est révélée par l'ajout spécifique de KOH entre 0 et 14 h.

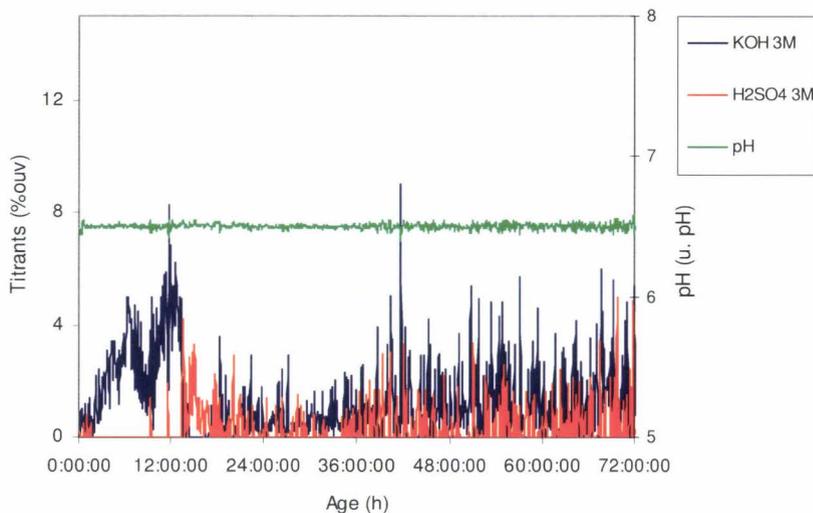


Figure 65 : Evolution des pulses en KOH 3 M et en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 M (% ouverture de pompe) et du pH (unités pH) lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* ATCC 6633 en milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L

Le ralentissement de la croissance est de nouveau constaté après 3 h, voir figure 3, mais est cependant moins marquée que celui observé au § 3.3.1.1. Première observation : cette diminution du taux de croissance ne peut être attribuée à un mauvais couplage énergétique lié aux valeurs basses de pH comme évoqué à titre d'hypothèse au § 3.3.1.1. car le pH est régulé à 6,5. Deuxième observation : la concomitance entre le ralentissement de la croissance et la limitation en oxygène avait été établie pour BBG100 au § 3.7.3. Dans le cas présent, l'expérience réalisée en bioréacteur permet théoriquement d'assurer une croissance strictement aérobie (\*) grâce à la régulation de la pression partielle en oxygène dissous au dessus de la valeur seuil de 10 % vol/vol. Dans l'hypothèse où la souche ATCC 6633 se comporte de façon identique à BBG100 en ce qui concerne la concomitance entre le ralentissement de la croissance et la limitation en oxygène, le ralentissement de la croissance n'est par conséquent pas attribuable à une limitation en oxygène.

(\*): À moins que la limite inférieure de 10 % ne corresponde déjà à une limitation en oxygène, ce qui paraît peu probable compte tenu de l'homogénéité du mélange dans un bioréacteur de petite taille.

Il est à noter qu'une baisse de l'aération a été constatée entre 6 h et 12 h d'âge en raison d'une baisse de la pression réseau d'air comprimé, ce problème technique n'ayant visiblement pas d'effet sur la valeur de l'oxygène dissous régulé à 10% grâce à la rampe d'agitation.

L'évolution de la densité optique à 600 nm en fonction du temps lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* ATCC 6633 en milieu de Landy modifié et additionné d'acide glutamique à 2 g/L est présentée sur la figure 66.

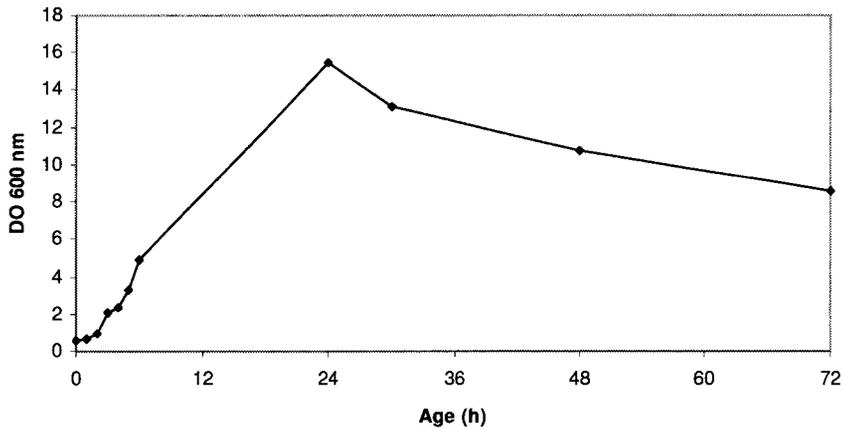


Figure 66 : Evolution de la densité optique à 600 nm en fonction du temps lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* ATCC 6633 en milieu de Landy modifié et additionné d'acide glutamique à 2 g/L.

La DO 600 nm atteint une valeur de 15,5 DO à 24 h, puis diminue fortement jusqu'à 72 h. Cette diminution, confirmée par des mesures du poids sec effectuées en parallèle, est liée à la lyse cellulaire et aussi au phénomène de sporulation observé par microscopie. Ces deux phénomènes s'expliquent par la longue durée du procédé discontinu et aussi par les quantités importantes de titrants ajoutées après 30 h. En effet, la figure 65 montre qu'à partir de 30 h, la régulation du pH s'effectue par ajout alterné de KOH et de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, signe d'une production et d'une consommation d'acides organiques faible. L'état physiologique du microorganisme ne justifie pas ces volumes importants de titrants délivrés par pulses continus. Ils s'expliquent en réalité par les difficultés à réguler le pH en raison de la présence de mousse dans le bioréacteur. La mousse piège et ralentit les gouttes de titrants délivrées par les pompes péristaltiques.

Le dosage des lipopeptides dans les échantillons prélevés dans le bioréacteur montre l'absence de mycosubtiline et de surfactine dans le milieu de culture. Par contre, l'analyse du milieu de culture débordé du bioréacteur en raison du moussage révèle une concentration de 39,4 mg/L en mycosubtiline et inférieure à 0,1 mg/L en surfactine (détectée mais non quantifiée). Il est intéressant de noter qu'une extraction du produit en continu par le moussage est envisageable pour la suite. De plus, la culture en bioréacteur sur milieu de Landy modifié

additionné de 2 g/L d'acide glutamique régulé à pH 6,5 permet l'obtention d'une bonne sélectivité de la synthèse des mycosubtilines par rapport aux surfactines.

La perte de volume liée au moussage lors cette culture de *B. subtilis* ATCC 6633 est de 130 mL, ce qui représente 4,3% du volume initial. Cette perte reste dans le même ordre de grandeur que le volume d'échantillonnage ou le volume de titrants ajoutés. Elle n'influe donc que peu sur le volume total de milieu de culture. Cependant, la quantité en mycosubtiline produite rapportée au volume initial de milieu de culture étant faible, 1,7 mg/L, on peut imaginer une perte de volume plus conséquente avec la souche surproductrice de mycosubtiline *B. subtilis* BBG100. La faible valeur de production pourrait être liée aux problèmes précités de régulation du pH qui ont eu pour effet de dégrader ou de précipiter la mycosubtiline contenue dans la mousse.

#### 5.2.1.2. CULTURES SANS REGULATION DU PH

*B. subtilis* ATCC 6633 est cultivé en mode discontinu sur milieu de Landy. Pour vérifier l'effet de la régulation du pH et s'affranchir des problèmes liés à cette régulation rencontrés au § précédent, le pH n'est pas régulé et sa valeur initiale égale à 7,0. La durée de la culture est de 72 h.

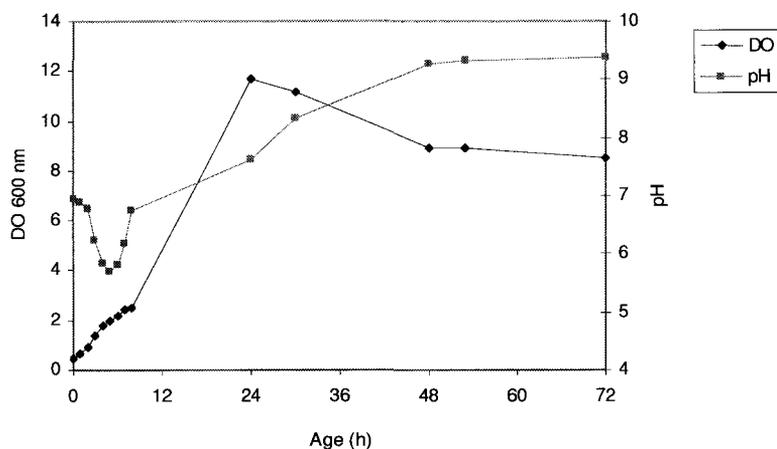


Figure 67 : Evolution de la densité optique à 600 nm en fonction du temps et du pH lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* ATCC 6633 en milieu de Landy. Données représentatives de 2 expériences.

La figure 67 montre qu'un ralentissement de la croissance est visible à partir de 3-4 h de culture. La DO augmente jusqu'à une valeur de 11,7 DO à 24 h. La phase de lyse / sporulation est détectée après 24 h alors que le pH avoisine une valeur élevée de 7,6. La diminution de la DO s'accroît ensuite et le pH atteint une valeur limite de 9,3 dès 48 h d'âge. Dans cette expérience, le pH varie fortement puisqu'il évolue entre 5,6 et 9,3.

Les quantités en mycosubtiline et en surfactine extraites dans le volume de surverse rapportées au volume initial de milieu de culture sont respectivement de 8 et 2 mg/L. La concentration en mycosubtiline finale, bien que faible par rapport à celle obtenue dans les mêmes conditions de culture en fioles d'Erlenmeyer, voir § 3.3.1.1., est légèrement meilleure que celle obtenue en présence d'une régulation du pH.

#### 5.2.1.3. EN BREF

Finale­ment, l'origine du phénomène de cassure de la courbe de croissance reste indéterminée mais le champ des possibilités se réduit grâce à cette première étude en bioréacteur : l'origine du phénomène ne semble ni liée à des valeurs trop basses de pH ni même à une limitation en oxygène.

Globalement, on ne constate pas de différences notables dans le comportement de *B. subtilis* ATCC 6633, qu'il soit cultivé avec régulation du pH ou sans. Le niveau moyen de production en mycosubtiline reste faible, autour de 3,5 mg/L. Pour limiter les problèmes d'amenée des titrants pour la régulation du pH, par la suite, des tuyaux en silicone affleurant à la surface du liquide seront utilisés pour prolonger les canules inox qui permettent de délivrer les titrants.

### **5.2.2. PRODUCTION DE MYCOSUBTILINE PAR *B. SUBTILIS* BBG100**

#### 5.2.2.1. CULTURE REGULEE EN PH

*B. subtilis* BBG100 est cultivé en mode discontinu sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique 2 g/L. Le pH est régulé à la valeur de 6,5. La durée de la culture est de 72 h.

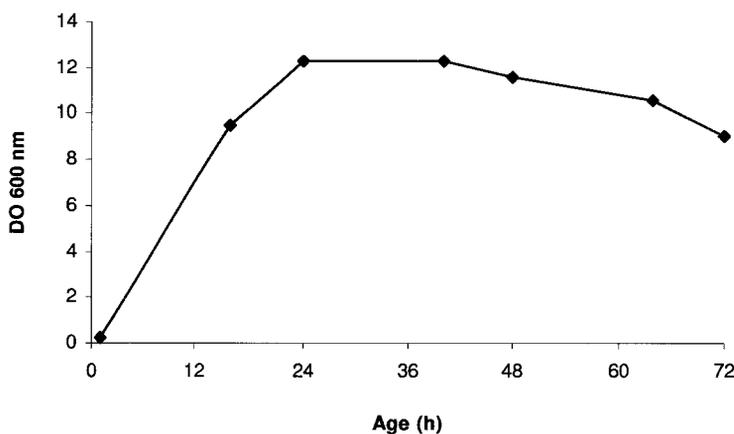


Figure 68 : Evolution de la densité optique à 600 nm en fonction du temps lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié et additionné d'acide glutamique à 2 g/L

Compte tenu de la faible fréquence d'échantillonnage (figure 68), le ralentissement de la croissance n'est pas observable sur la courbe. La DO augmente jusqu'à une valeur de 12,3 DO à 24 h. La phase de lyse / sporulation débute après 40 h. La diminution de la DO s'accroît ensuite jusqu'à atteindre la valeur de 9,0.

Comme au § 5.2.1., les lipopeptides ne sont pas détectés dans les échantillons prélevés dans le bioréacteur. Les quantités en mycosubtiline et en surfactine extraites dans le volume de surverse rapportées au volume initial de milieu de culture sont respectivement de 67 et 6,2 mg/L. La concentration en mycosubtiline est 39 fois supérieure à celle obtenue dans les mêmes conditions avec la souche *B. subtilis* ATCC 6633 montrant l'importance du caractère constitutif de la production lors d'un procédé discontinu.

Le volume collecté de surverse est de 130 mL. Cette valeur est identique à celle obtenue au § 5.2.1.1. Ce résultat peut paraître surprenant. Il montre que le volume de surverse lié au moussage n'est pas corrélé à la quantité de mycosubtiline produite. Ce phénomène sera abordé au § 5.3.2. lors de l'étude de la capacité moussante du milieu de culture en fonction de la vitesse d'agitation.

### 5.2.2.2. CULTURE NON REGULEE EN PH

*B. subtilis* BBG100 est cultivé en mode discontinu sur milieu de Landy. Le pH est laissé libre et sa valeur initiale égale à 7,0. La durée de la culture est de 72 h. Les résultats sont présentés sur la figure 69.

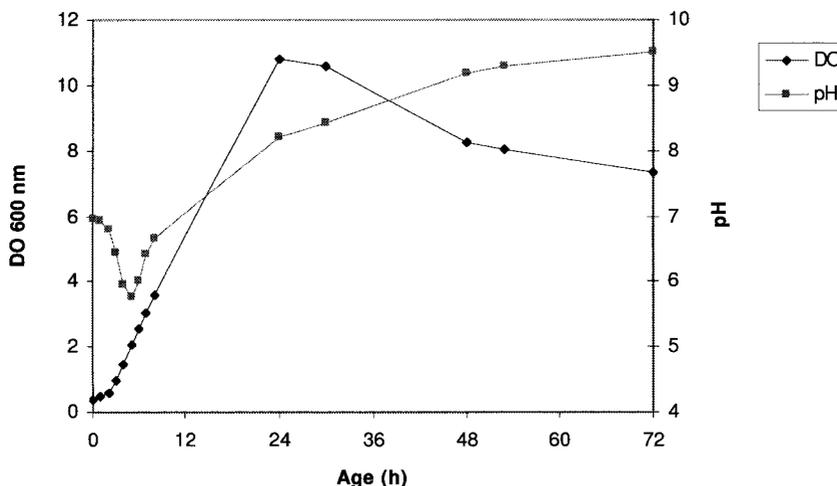


Figure 69 : Evolution de la densité optique à 600 nm en fonction du temps lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié et additionné d'acide glutamique à 2 g/L

La DO augmente jusqu'à une valeur de 10,8 à 24 h. La phase de lyse / sporulation conduit ensuite à une diminution de la DO jusqu'à atteindre la valeur de 7,35. Les variations du pH sont comprises entre 5,8 et 9,5 ce qui constitue un intervalle élevé favorisant la phase de lyse cellulaire.

Les quantités en mycosubtiline et en surfactine extraites dans le volume de surverse rapportées au volume initial de milieu de culture sont respectivement de 66 et 0,5 mg/L. La concentration en mycosubtiline est huit fois supérieure à celle obtenue dans les mêmes conditions avec la souche *B. subtilis* ATCC 6633.

La perte de volume liée au moussage lors cette culture de *B. subtilis* BBG100 est de 820 mL, ce qui représente 27% du volume initial. Au-delà des précautions à prendre sur le

calcul des concentrations, cette perte importante pose des problèmes techniques. En effet, dans ces conditions de travail, la turbine de Rushton supérieure ne plonge plus dans le milieu nutritif affectant le contrôle de l'oxygène dissous par l'agitation. De plus, nous avons remarqué *de visu* qu'une zone d'hyper-moussabilité était obtenue au moment où la turbine sortait du liquide. Cette observation nous a conduit à la mise au point d'un procédé alimenté opérant à volume constant.

#### 5.2.2.3. EN BREF

De même que pour *B. subtilis* ATCC 6633, on ne constate pas de grandes différences dans le comportement de *B. subtilis* BBG100, qu'il soit cultivé avec régulation du pH ou sans. Les différences observées ne sont pas suffisantes pour invoquer l'effet du pH sur les deux souches. Le niveau moyen de production en mycosubtiline a été multiplié par un facteur moyen de 19 rendant compte du caractère constitutif fort du promoteur P<sub>repU</sub>.

#### 5.2.2.4. VALORISATION DES RESULTATS

Les comparaisons des productions de mycosubtiline et de surfactine entre *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteur ont été intégrées à un ensemble plus large de résultats obtenus au laboratoire ProBioGEM et ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « Applied and Environmental Microbiology » en 2005.

### 5.2.3 LIMITATION DU MOUSSAGE LORS DE CULTURES DE *B. SUBTILIS* BBG100

#### 5.2.3.1 SYSTEMES PHYSIQUES D'ELIMINATION OU DE LIMITATION DE LA MOUSSE

##### 5.2.3.1.1 Réfrigération

Deux réfrigérants ont été installés en série au niveau de la sortie des gaz du bioréacteur afin de refroidir les mousses débordantes. La double enveloppe dans laquelle circule de l'eau froide permet de condenser la mousse. Néanmoins la capacité d'échange de cette installation n'a pas été suffisante et n'a pas permis d'éviter le débordement de mousse lors de la culture de *B. subtilis* BBG100 en bioréacteur.

##### 5.2.3.1.2. Dévésiculation

Le deuxième test a été effectué avec un dispositif de dévésiculation des mousses utilisé en traitement des eaux usées. Ce matériel a été prêté par la société EIF. La mousse circule dans une cartouche contenant des billes de verres de petites tailles. L'augmentation de la surface de contact tend à casser la mousse. Les condensats sont ensuite réinjectés dans le bioréacteur. Le gaz sortant dépourvu de mousse peut ensuite être analysé pour quantifier, dans notre cas, l'oxygène et dioxyde de carbone. Le principe de fonctionnement est présenté sur la figure 70.

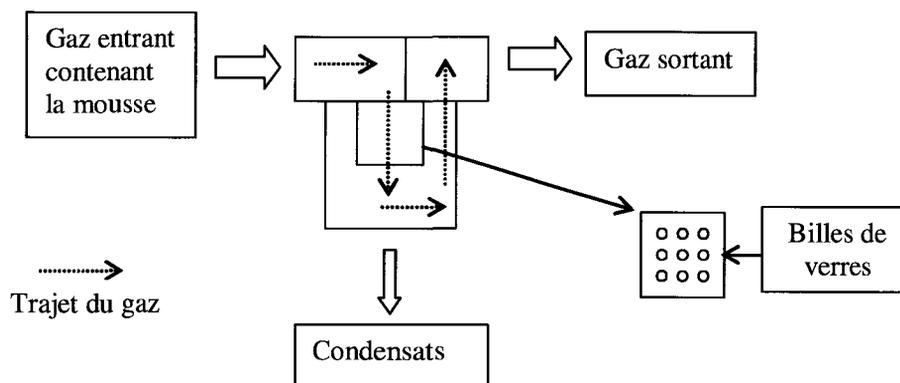


Figure 70 : Principe de fonctionnement du dévésiculateur

Lors d'une culture discontinue en bioréacteur de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L régulée à pH 6,5, l'efficacité du système n'a pas permis l'élimination des mousses au niveau du gaz sortant. Le dispositif testé étant par ailleurs déjà sur-dimensionné pour notre application, selon le fournisseur EIF, le principe de dévésiculation a été abandonné. Il ne permet pas d'éliminer les mousses issues d'un moût à capacité moussante élevée (voir le § 5.3.2).

### 5.2.3.2. CONTROLE DE LA MOUSSE PAR AJOUT D'ANTIMOUSSE

#### 5.2.3.2.1. Introduction

Suite aux essais réalisés avec les systèmes physiques d'élimination de la mousse, nous avons testé différents types d'antimousse utilisés dans le domaine agro-alimentaire et dans celui de la production d'auxiliaires technologiques : huile de colza, huile de soja et Hodag (monostéarate diéthylène glycol, triglycérides). Trois types d'essais préliminaires ont été réalisés afin de mesurer l'effet de ces composés sur la capacité moussante du milieu, sur la croissance du micro-organisme et sur la synthèse de mycosubtiline. De plus, il a été vérifié que l'ajout des différents antimousses dans le milieu de culture n'interférait pas avec la méthode de purification des lipopeptides sur gel ODS.

#### 5.2.3.2.2. Détermination des concentrations et effets des antimousses

Les huiles de colza et de soja sont testées à 2, 5 et 10 g/L. L'antimousse Hodag est testé à une concentration de 0,1 et 0,4 mL/L. Les antimousses sont ajoutés au milieu de culture en présence d'une concentration de 50 mg/L en mycosubtiline. Les différentes expériences de moussage sont réalisées dans le bioréacteur avec une aération fixée à 0,25 VVM et une agitation à 300 rpm. La concentration minimale pour éviter toute formation de mousses est de 5 g/L pour les huiles et 0,1 mL/L pour l'antimousse.

L'effet des antimousses sur le dosage de lipopeptide est évalué. La purification sur colonne C18 et le dosage d'un échantillon de mycosubtiline de concentration connue, 223 mg/L, est réalisé alternativement en présence de 5 g/L d'huile de colza, 5 g/L d'huile de soja et 0,1 mL/L d'antimousse Hodag. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 26 : Dosage de la mycosubtiline en présence d'antimousse

	[mycosubtiline] (mg/L)
<b>Témoin</b>	223
<b>Huile de soja 5 g/L</b>	200
<b>Huile de colza 5 g/L</b>	181
<b>Antimousse Hodag 0,1 mL/L</b>	156

Le tableau 26 montre une influence variable des antimousses testés sur le dosage des lipopeptides. La récupération du produit est de l'ordre de 89 % pour l'huile de soja, de 81 % pour l'huile de solza et de 69 % pour l'antimousse Hodag. Cette influence pourrait s'expliquer par la saturation des sites de liaisons du gel C18 des cartouches de purification ou par l'encapsulation des lipopeptides formant des complexes par liaison hydrophobe avec les antimousses.

Sachant que les antimousses utilisés sont des sources carbonées susceptibles d'être métabolisées par *B. subtilis*, leur effet a été évalué sur la croissance de BBG100. Dans notre cas, ils pourraient aussi moduler le profil de biosynthèse des isoformes de mycosubtilines car elles constituent une source d'acides gras transformables puis incorporables dans les mycosubtilines. Afin de déterminer ces effets, plusieurs cultures de BBG100 ont été réalisées en milieu de Landy modifié MOPS 100 mM pH 7,0 (figure 71).

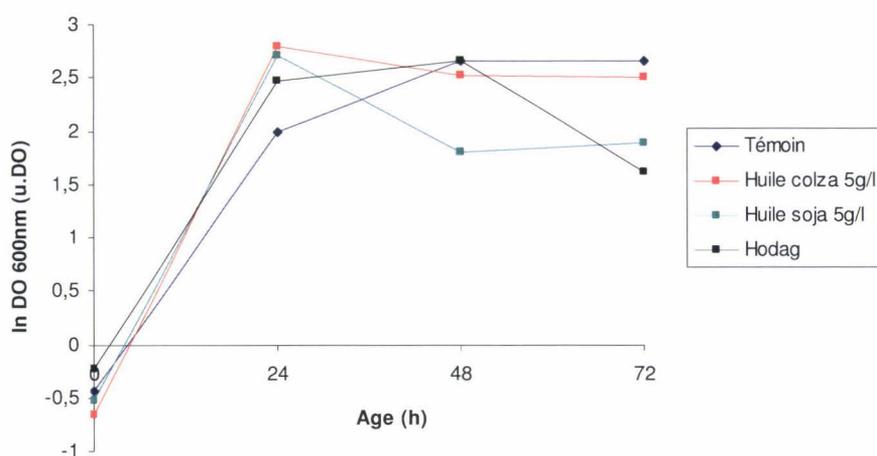


Figure 71 : Evolution de la densité optique à 600 nm lors de cultures en fioles de *B. subtilis* BBG100 réalisées en milieu de Landy modifié MOPS 100 mM pH 7,0 et en présence d'huile de colza à 5 g/L, d'huile de soja à 5 g/L ou d'antimousse Hodag à 0,1 mL/L

La culture témoin atteint une DO de 14,3 DO à 48 h d'âge. La croissance est sensiblement plus importante et aussi plus rapide en présence des huiles puisqu'une DO anormalement élevée d'environ 16,5 est atteinte dès 24 h de culture. Cette observation indique que les huiles sont probablement métabolisées par la souche. Ce problème donnant lieu à une étude en soi, aucun dosage des huiles n'a été réalisé pour confirmer cette hypothèse. Une chute de la DO précoce est ensuite observable. Elle pourrait être liée à la difficulté à mesurer la DO en raison de la solubilisation progressive de l'huile par les surfactants synthétisés par BBG100. Une chute de la DO est observable après 48 h de culture en présence de l'antimousse Hodag. Les résultats de production de mycosubtiline sont donnés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Concentration en mycosubtiline (mg/L) pour les cultures avec antimousse

	[mycosubtiline] mg/L
<b>Témoin</b>	223
<b>Huile colza 5 g/L</b>	3
<b>Huile soja 5 g/L</b>	2
<b>Antimousse Hodag 0,1 mL/L</b>	95

L'ajout d'huile provoque une diminution très significative de la synthèse de mycosubtiline. Pour rappel, les analyses de mycosubtiline étaient sous-évaluées de 11 % en présence de 5 g/L d'huile de soja et de 19 % en présence d'huile de 5 g/L de colza. Mais cet effet ne suffit pas à lui seul expliquer la diminution de la production de la synthèse de mycosubtiline observée lors des cultures. Il y a donc un effet physiologique de régulation de la synthèse des mycosubtilines en présence d'huile de colza ou de soja. Concernant les cultures réalisées en présence d'antimousse Hodag, une concentration de 95 mg/L de mycosubtiline est obtenue, soit une diminution de 57 % de la production de mycosubtiline par rapport au témoin. Pour rappel, une sous-évaluation de 31 % du dosage de la mycosubtiline en présence de 0,1 mL/L d'antimousse Hodag a été montrée. Dans ces conditions, la diminution de la production de mycosubtiline par rapport au témoin n'est plus que de 39 %.

#### 5.2.3.2.3. Culture de *B. subtilis* BBG100 en bioréacteur en présence d'antimousse Hodag.

Compte tenu des avantages certains à travailler sans moussage, une culture discontinue de *B. subtilis* BBG100 est réalisée en bioréacteur sur milieu de Landy modifié additionné de 2 g/L d'acide glutamique auquel est ajouté 0,1 ml/L d'antimousse Hodag. Le pH est régulé à 6,5 et le niveau de mousse contrôlé par ajout automatique d'antimousse Hodag. Les résultats sont présentés dans la figure 72.

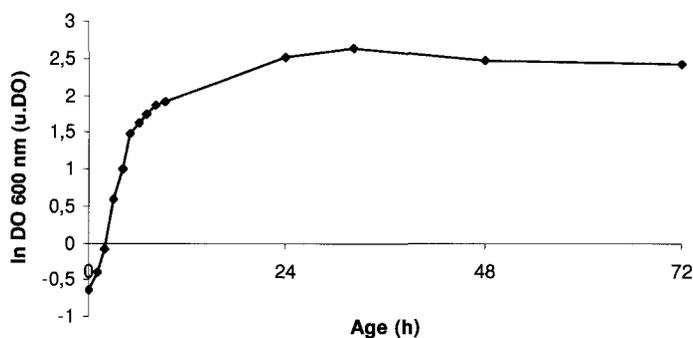


Figure 72 : Evolution de la densité optique à 600 nm en fonction du temps lors d'une culture discontinue de *B. subtilis* BBG100 en milieu de Landy modifié et additionné d'acide glutamique à 2 g/L régulée à pH 6,5. Le niveau de mousse est régulé par l'ajout de Hodag.

La courbe de croissance atteint un maximum de 14 DO vers 32 h de culture. L'émulsion provoquée par l'agitation mécanique du milieu de culture contenant l'antimousse Hodag et les tensio-actifs synthétisés par la souche pose des difficultés de mesure de la densité optique. Une lecture de DO contre le surnageant de culture est donc entreprise sur tous les échantillons afin de s'affranchir de l'effet du changement des caractéristiques optiques du milieu de culture.

L'ajout de l'antimousse Hodag permet pour la première fois dans le cadre de ce travail d'analyser les gaz lors d'une culture en bioréacteur à agitation mécanique. Comme nous l'avons vu au § 3.7.3.1., cette analyse permet d'accéder à des informations sur la respiration du microorganisme au travers du calcul du quotient respiratoire. Le QR est exprimé par le rapport CTR/OTR.

Le suivi du QR est représenté sur la figure 73. L'analyseur est débranché par précaution pendant les nuits, représentées par les zones grisées.

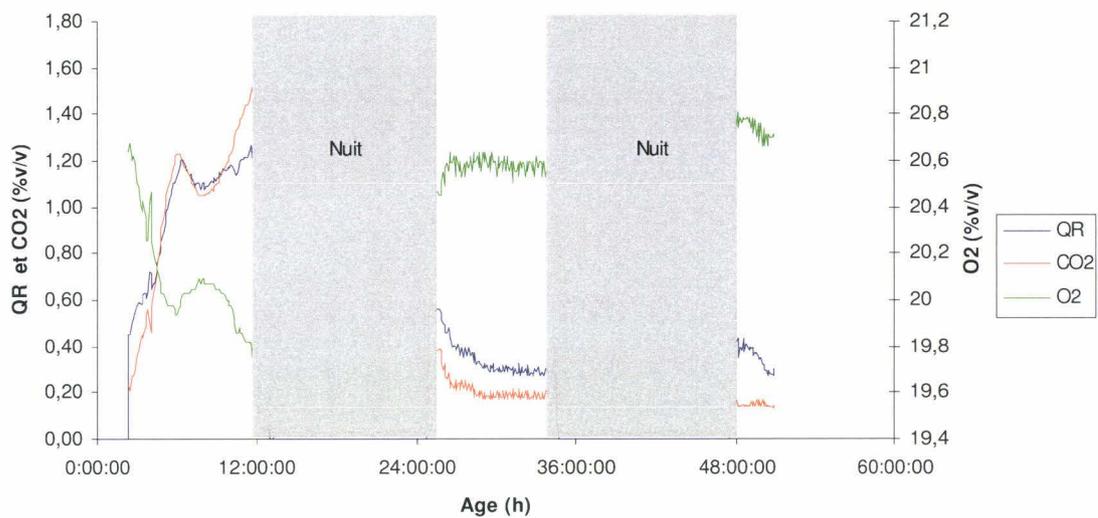


Figure 73 : Evolution des valeurs du CO<sub>2</sub> (%v/v), de l'O<sub>2</sub> (%v/v) et du QR (sans unité) au cours de la culture de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L. Le pH est régulé à 6,5 par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M et KOH 3M.

Durant les 6 premières heures de la culture, la valeur du QR augmente progressivement. Dans certaines cultures nous avons observé une diminution progressive

durant ces premières heures. Ce phénomène est difficilement interprétable physiologiquement. Il est probablement dû aux faibles valeurs de consommation d'O<sub>2</sub> et de production de CO<sub>2</sub> mesurées qui génèrent une erreur importante. Durant ces heures, la consommation en O<sub>2</sub> et le dégagement du CO<sub>2</sub> augmentent, ces phénomènes étant liés à la multiplication des microorganismes dans le milieu. Entre 6 h et 12 h de culture, le QR se stabilise aux environs de 1,2. Nous avons vu au § 3.7.3.1. que le QR se stabilisait aux environs de 1,4 et que c'était dû à la production d'acides organiques tels que l'acide acétique produit par les souches de *B. subtilis* lors d'une croissance limitée en oxygène sur glucose et acide glutamique. La valeur légèrement plus basse du QR, 1,2 au lieu de 1,4, est liée à la très faible production d'acide acétique dans notre cas. Elle s'explique car la valeur de l'oxygène dissous ne tombe jamais sous le seuil de 10% v/v de la saturation en oxygène dans le cas de la culture en bioréacteur.

Entre 25 et 34 h d'âge, la valeur de QR diminue progressivement avant de se stabiliser aux environs de 0,3 qui indique une consommation des acides organiques produits par la souche en début de culture.

La production de mycosubtiline lors de cette culture discontinue est très faible, à la limite de la détection analytique. Pourtant la formation de mousses a été observée à partir de 4 h d'âge et a nécessité un ajout continu d'antimousse Hodag sur la durée du procédé et qui a représenté 8 mL en valeur cumulée. Il y a donc eu production d'une quantité significative de tensioactifs mais la purification sur colonne C18 dosage puis le dosage en CLHP ne permet pas de les retrouver. Un test en chromatographie couche mince a été entrepris (figure 74).

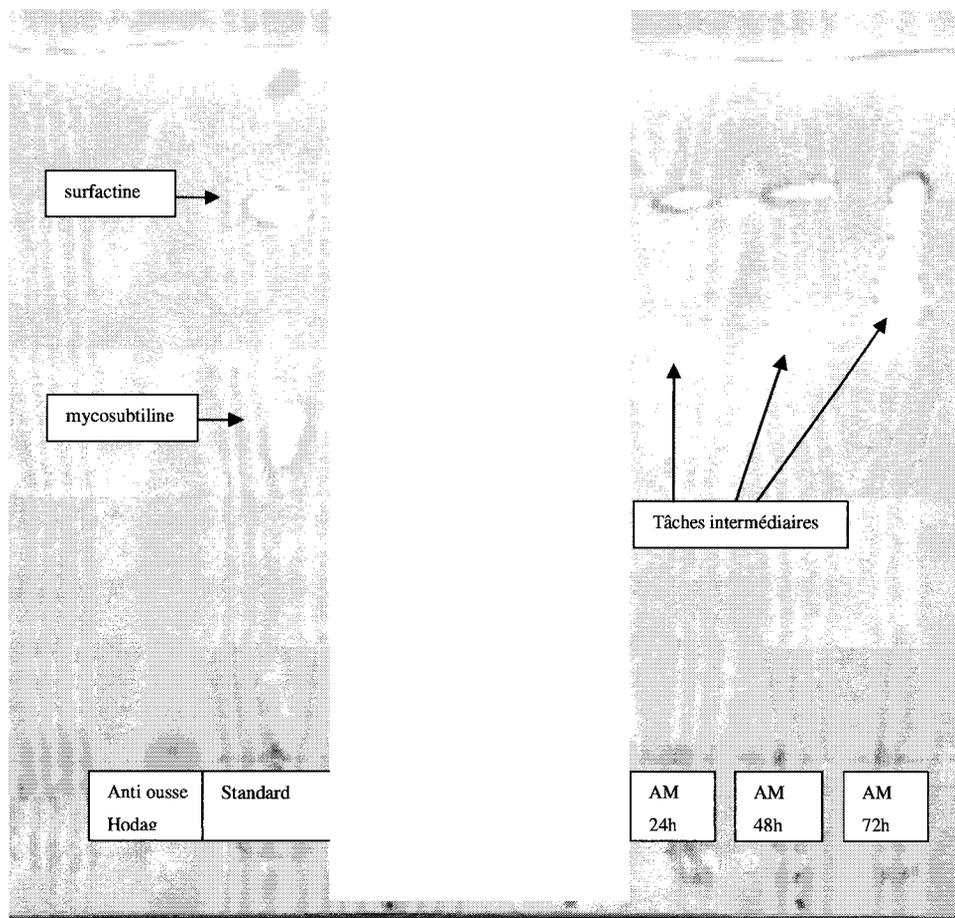


Figure 74 : Chromatographie en couche mince réalisée avec (de gauche à droite) un témoin d'antimousse à 0,1 mL/L, un témoin de mycosubtiline additionné de surfactine à 50 mg/L, des surnageants de culture prélevés à 24 h, 48 h et 72 h sur la culture de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à 2 g/L, pH 6,5.

Concernant les témoins, aucune bande n'apparaît sur la couche mince pour l'antimousse Hodag et deux bandes sont détectées pour le standard composé d'un mélange de mycosubtiline et de surfactine. La valeur du rapport frontal  $R_f$  est de 0,8 pour la surfactine et 0,6 pour la mycosubtiline. Les surnageants de culture à 24, 48 et 72 h présentent une bande correspondant à la surfactine. Aucune bande n'apparaît pour la mycosubtiline. Néanmoins, une tache diffuse est détectée pour un  $R_f$  entre 0,7 et 0,8. Cette tache pourrait correspondre au complexe mycosubtiline-antimousse Hodag évoqué au § 5.2.3.2.2.

#### 5.2.3.2.4. En bref

L'efficacité des antimousses est montrée pour limiter la formation de la mousse générée par la mycosubtiline. En revanche, le dosage des lipopeptides présente des difficultés réelles en présence de ces antimousses. De plus, il semblerait que les huiles de soja ou de colza soient métabolisées par *B. subtilis* ce qui constitue une interférence métabolique rendant les études physiologiques difficiles. Dans ce contexte il paraît difficile d'adopter une stratégie basée sur l'utilisation d'antimousses.

### 5.3. PROCÉDES SEMI-DISCONTINUS A ALIMENTATION EXPONENTIELLE

#### 5.3.1. INTRODUCTION

Peu de connaissances ont été générées par le passé sur les bioprocédés où l'extraction du produit d'intérêt se fait de manière continue dans des collecteurs de mousse. Notre travail propose dans une première partie une solution simple pour favoriser les sorties de mousse afin de maintenir un niveau de liquide constant dans le bioréacteur. Ce niveau est maintenu constant en égalisant le débit de sortie des mousses et le débit d'alimentation, de sorte à pouvoir se référer à un procédé en continu. A ce stade, il est vérifié que la mousse récoltée dans les collecteurs contient la totalité des tensioactifs synthétisés par la souche. La concentration en biomasse dans le volume soutiré étant inférieure à celle dans le bioréacteur, le procédé obtenu se rapproche d'un procédé en continu avec recyclage de la biomasse. Se basant sur ces observations, une étape de modélisation de l'évolution de la biomasse suivie d'une validation est proposée.

La stratégie d'alimentation a été appliquée en se référant à une culture semi-discontinue limitée en carbone, classiquement appelée Exponential FedBatch Culture ou EFBC. Compte tenu des débordements de mousses observés durant ce procédé, nous l'appellerons O-EFBC (figure 75). Ces débordements s'effectuent en continu en raison du caractère constitutif de la production de mycosubtiline, sous contrôle du promoteur  $P_{repU}$  chez *B. subtilis* BBG100. Une représentation schématique de l'O-EFBC est présentée sur la figure 77.

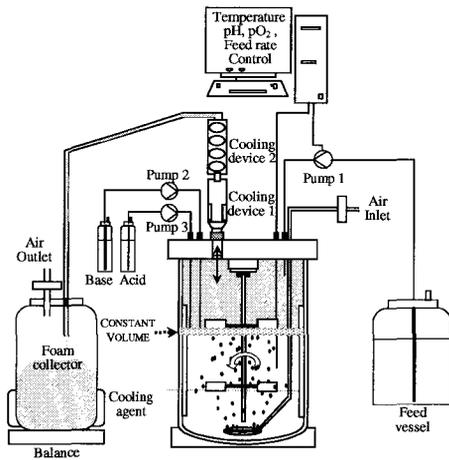


Figure 75 : Représentation schématique de l'O-EBFC. Le collecteur de mousse est connecté au bioréacteur via la sortie des gaz. Il est réfrigéré par un dispositif de poches de gel eutectique. L'alimentation en milieu frais, en base et en acide est assurée par les pompes 1, 2 et 3.

### 5.3.2. OPERATION A VOLUME CONSTANT

Les mobiles fixés sur l'axe d'agitation du bioréacteur sont deux turbines de Rushton de largeur  $L_t$  et de hauteur  $W_t$ , disposées de manière spécifique (figure 76). La turbine inférieure est immergée dans le milieu de culture à une hauteur  $H_0$ , comme cela se fait classiquement dans une culture en bioréacteur, pour assurer le mélange et le cisaillement des bulles d'oxygène. La turbine supérieure est fixée juste au-dessus de la hauteur  $H_L$  du milieu de culture.

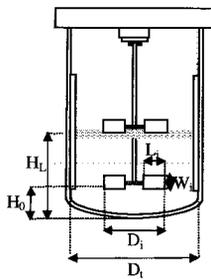


Figure 76 : Facteurs géométriques exprimés en cm du bioréacteur à agitation mécanique et aéré utilisé pour l'O-EBFC.  $D_i=7,65$ ,  $H_t/D_i=1,83$  ;  $D_t/D_i=2,22$  ;  $H_0/D_i=1,00$  ;  $W_t/D_i=0,20$  ;  $L_t/D_i=0,25$

Pendant la phase d'alimentation du procédé, la turbine supérieure est progressivement immergée dans le milieu liquide favorisant le mélange à l'interface gaz-liquide. Dans ces conditions, la turbine se charge à l'interface et augmente la capacité moussante (CM) du milieu. Ce paramètre a été évalué en se basant sur la méthode de la colonne à bulle développée par Saint-Jalmes *et al.* (2005). Seule différence, l'éprouvette graduée est remplacée par le bioréacteur. Le débit d'air est maintenu constant pour ces expériences. Seule la vitesse périphérique en bout de pale varie. La hauteur de mousse est mesurée et la capacité moussante calculée selon la formule :

$$CM = \frac{\text{Volume de mousse stabilisé (L)}}{\text{Volume de gaz injecté (L)}}$$

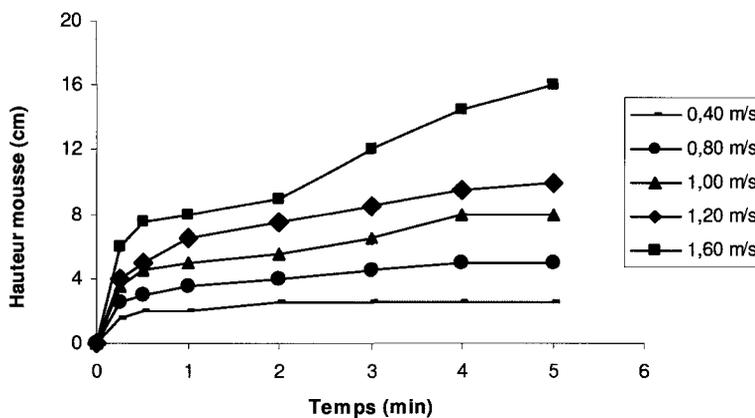


Figure 77 : Cinétique (min) de l'évolution de la hauteur de mousse (Kim *et al.*, 2004) mesurée dans le bioréacteur en fonction de différentes vitesses périphériques en bout de pale : 0,40, 0,80, 1,00, 1,20 et 1,60 m/s. Les expériences sont réalisées en présence d'une concentration de 2 mg/L en mycosubtiline et 1,3 g/L en biomasse, à un débit d'aération de 0,75 L/min, à 30°C et pH 6,5.

Les expériences menées à des vitesses périphériques de 0,40, 0,80, 1,00 et 1,20 m/s ont permis d'atteindre une valeur constante de la hauteur de mousse (figure 77) correspondant respectivement à des capacités moussantes CM de 0,15, de 0,30, de 0,48 et de 0,60. Selon (Saint-Jalmes *et al.*, 2005), une CM inférieure à 0,1 représente une capacité moussante faible.

Dans notre application, le but recherché est de favoriser le moussage. Aussi, la limite basse de la plage d'agitation qui sera utilisée lors de l'O-EFBC correspondra à une vitesse périphérique minimale de 0,80 m/s assurant une valeur de CM de 0,30. La figure montre que l'expérience menée à 1,60 m/s n'a pas permis la stabilisation de la hauteur de mousse dans la durée d'expérience. Aucune capacité moussante n'a pu par conséquent être calculée *stricto sensu*. Le rapport volume de mousse/volume d'air injecté est égal à 0,97 après 5 min, indiquant une CM élevée approchant la valeur de 0,99 obtenue pour l'iturine A à longue chaîne (Razafindralambo *et al.*, 1998) et de 0,98 obtenue pour la surfactine (Razafindralambo *et al.*, 1996). Comme nous n'avons pas pu observer la stabilisation de la hauteur de mousse dans le bioréacteur pour une vitesse périphérique de 1,60 m/s, nous avons préféré choisir une vitesse périphérique maximale de 1,20 m/s assurant une valeur de CM de 0,60. La gamme d'agitation a été finalement fixée entre 0,80 et 1,20 m/s assurant respectivement une CM de 0,30 et de 0,60.

### 5.3.3. PRESENTATION DE L'O-EFBC

Le procédé a été divisé en trois étapes principales (figure 78). Durant la phase *I*, les cellules sont cultivées 24 h dans une culture en mode discontinu. La vitesse d'agitation augmente progressivement pour maintenir le taux d'oxygène dissous au-dessus de 10% de la concentration de saturation jusqu'à ce que la source principale de carbone ait été épuisée. On observe la re-consommation des sous-produits comme l'acétate durant la phase *I*. Le volume *V* de milieu dans le bioréacteur diminue en raison du débordement de mousse dû à la production constitutive du mycosubtiline. Dans la phase *II*, les cellules sont cultivées dans un mode semi-discontinu et le volume *V* augmente exponentiellement. Le débit d'alimentation est calculé selon la formule dérivée de l'EFBC carbone-limitant :

$$f_{in}(t) = \frac{V_0 X_0}{Y_{X/S}^{Feed} (S_{in} - S_0)} \cdot \frac{e^{t/\tau}}{\tau} = R(t_0) \cdot \frac{e^{t/\tau}}{\tau}$$

Avec  $R(t_0)$  la valeur initiale du débit d'alimentation calculé à partir de la quantité initiale  $V_0 X_0$  de biomasse, le rendement en biomasse sur glucose fixé à  $0,30 \text{ g g}^{-1}$ , proche de la valeur de  $0,31 \text{ g g}^{-1}$  rapportée par Lee *et al.* (1997),  $S_{in}$  la concentration en glucose dans le

milieu d'alimentation, fixé à  $40 \text{ g L}^{-1}$ ,  $S_0$  la concentration en glucose résiduel dans le bioréacteur et  $\tau$  une constante de temps.

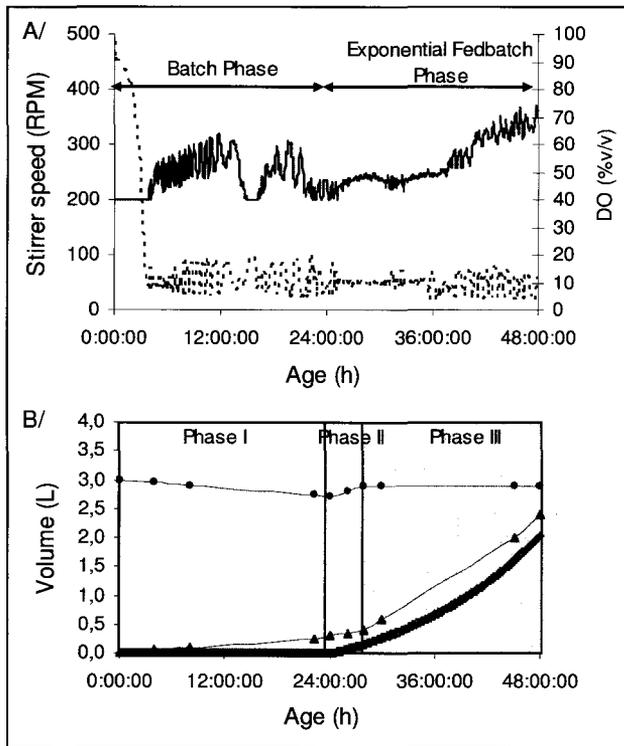


Figure 78 : (A). Evolution de la vitesse d'agitation et du pourcentage d'oxygène dissous durant une culture débordante de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié additionné d'acide glutamique à  $2 \text{ g/L}$ . Le pH est régulé à 6,5 par ajout de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M et KOH 3M. La culture est réalisée à  $30^\circ\text{C}$  et à un taux de dilution  $1/\tau=0,06 \text{ h}^{-1}$ . (B) Evolution du volume  $V$  dans le bioréacteur (—●—), du volume  $V_{\text{col}}$  dans le collecteur de mousse (—▲—) et du volume d'alimentation cumulé (—). La phase I représente la phase discontinue, la phase II l'EFBC et la phase III l'O-EFBC. Les phases I and II sont menées à volume  $V$  non constant et la phase III à volume  $V$  constant.

La phase III correspond à un mode de fonctionnement à volume  $V$  constant où le débit de débordement de mousse devient égal au débit d'alimentation. Pendant des phases II et III,

la vitesse d'agitation augmente progressivement reflétant la demande croissante en oxygène des cellules qui se divisent. La durée de ces phases dépend des valeurs de  $R(t)$ . Huit expériences d'O-EFBC sont réalisées sur une plage de taux d'alimentation allant de 0,008 à 0,086 h<sup>-1</sup>.

#### 5.3.4. MODELISATION ET ASPECTS THEORIQUES

Le modèle de croissance doit prendre en compte les phases II et III. Un modèle dynamique basé sur un bilan matière dans le bioréacteur et dans le collecteur de mousse a été construit à partir du modèle décrit par Bastin and Dochain, 1990. Cette partie a été réalisée en collaboration avec S. Chenicker et J-Ph. Cassar du Laboratoire LAGIS.

##### 5.3.4.1. EQUATIONS DYNAMIQUES DU MODELE

Le modèle proposé est non-linéaire. Toutes les variables sont dépendantes du temps mais pour plus de lisibilité, cette mention n'est pas précisée lorsque jugée non nécessaire. Le bilan matière sur la biomasse et le substrat dans le bioréacteur est donné par :

$$\frac{dVX}{dt} = \mu VX - X_{out} f_{out} \quad \text{avec} \quad \mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S}$$

$$\frac{dVS}{dt} = -\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_s\right) VX + S_{in} f_{in} - S f_{out}$$

$$\frac{dV}{dt} = f_{in} - f_{out}$$

Où le taux de croissance spécifique  $\mu$  est donné par l'équation de Monod. Le bilan matière sur la biomasse dans le collecteur de mousse est donné par :

$$\frac{dV_{col} X_{col}}{dt} = X_{out} f_{out}$$

A ce stade, les paramètres du modèle relatifs aux caractéristiques physiologiques du microorganisme sont au nombre de quatre :  $\mu_{max}$ ,  $K_S$ ,  $m_s$  et  $Y_{X/S}$ .

#### 5.3.4.2. RELATION ENTRE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE DANS LE BIOREACTEUR ET DANS LA MOUSSE

Dans une culture en continu sans recyclage de biomasse, la concentration en biomasse dans l'effluent est identique à celle dans le bioréacteur. Dans le cas d'une culture débordante, seulement une partie de la biomasse est extraite. Cette concentration en biomasse  $X_{out}$  dans la mousse sortie du bioréacteur est exprimée par la relation linéaire :

$$X_{out} = \alpha X + \beta$$

Avec  $\alpha$  et  $\beta$  représentant deux paramètres supplémentaires du modèle. Cette relation implique deux cas de figure :  $X_{out}$  est proportionnel à  $X$  ( $\beta = 0$ ) ou  $X_{out}$  est indépendant de  $X$  ( $\alpha = 0$ ). Le premier cas correspond à une culture avec recyclage partiel (Partial Recycling Fermentation).

#### 5.3.4.3. DESCRIPTION DU DEBIT DE MOUSSE DEBORDANT

Durant la phase *II*, le débit de mousse sortant est négligeable, soit :

$f_{out} = 0$  L.h<sup>-1</sup>. Le volume de milieu dans le bioréacteur,  $V$ , s'exprime en fonction du temps et dépend principalement du débit d'alimentation exponentiel  $f_{in}$ .

Durant la phase *III*, le débit de débordement de mousse devient égal au débit d'alimentation. Le procédé opère à volume  $V$  constant :

$$f_{out} = f_{in}$$

Afin de vérifier ces deux conditions et d'assurer la transition entre les phases *II* et *III*, une fonction permettant de simuler globalement l'évolution du débit de mousse débordant est proposée :

$$f_{out} = f_{in} \frac{C}{V_{lim} - V} \text{ avec } C \text{ une constant égale à } 10^{-3} \text{ L.}$$

Le volume  $V$  stabilisé en phase *III* devient égal à :

$$V_{\text{lim}} - C$$

### 5.3.5. STRATEGIE D'ESTIMATION DES PARAMETRES

#### 5.3.5.1 SCHEMA D'OPTIMISATION

L'évaluation de paramètres consiste à trouver un ensemble de valeurs appropriées pour les paramètres du modèle en utilisant les données expérimentales disponibles. Selon certains auteurs, l'identification de paramètres de modèles dynamiques non-linéaires peut être appliquée aux cultures de microorganismes (Gao *et al.*, 2005). La qualité de l'optimisation dépend de la qualité des données qui est elle-même affecté par l'incertitude inhérente à chaque analyse. Une fonction appelée « fonction objectif » est choisie. Elle reflète les différences entre les données expérimentales et les sorties du modèle. Elle peut se définir comme la somme des erreurs au carré entre les données expérimentales et les sorties du modèle :

$$J(\theta) = \sum_{j=1}^{N_E} \sum_{i=1}^{N_S(j)} (\xi_{ij} - \hat{\xi}_{ij})^T (\xi_{ij} - \hat{\xi}_{ij})$$

$$\theta^* = \text{Arg min}_{\theta} (J(\theta))$$

Avec  $N_E$  le nombre d'expériences,  $N_S(j)$  le nombre d'échantillons dans l'expérience  $j$ ,  $\xi$  et  $\hat{\xi}$  les vecteurs respectifs des valeurs mesurées et simulées,  $\theta$  le vecteur des paramètres initiaux et  $\theta^*$  le vecteur des paramètres optimisés.

Le modèle non-linéaire choisi impose un procédé itératif pour l'évaluation de ses paramètres. Le processus d'optimisation décrit sur la figure 79 procède par ajustements itératifs des valeurs des paramètres, conduisant pas à pas la fonction objectif à son minimum :

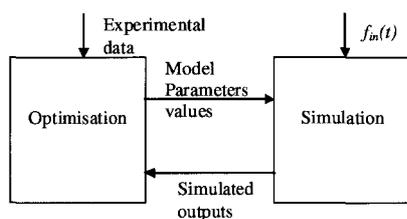


Figure 79 : Diagramme d'optimisation du modèle

Une fois le minimum de la fonction objectif atteint, les valeurs de paramètres obtenues sont gardées pour être employées dans le modèle. Les méthodes sans contraintes pour l'évaluation de paramètre ne prennent pas en compte les informations sur les valeurs limites de ces paramètres (Syed Mustapha et Phillips, 2000). Alternativement, les méthodes avec contraintes sont soumises à des valeurs limites (Roll *et al.*, 2005) réduisant de ce fait la taille du domaine dans lequel la solution optimale est recherchée. Un choix judicieux des valeurs limites mais aussi des valeurs initiales est donc nécessaire pour atteindre le minimum global de la fonction objectif. Dans notre cas, les contraintes sur les limites fixées au modèle seront les limites physiologiques. Ainsi, le rendement de croissance sur le substrat,  $Y_{X/S}$  sera examiné entre 0,19 et 0,45 g g<sup>-1</sup> et le taux de croissance spécifique maximal,  $\mu_{max}$ , entre 0,30 et 0,40 h<sup>-1</sup>. Pour notre application, la fonction quadratique objectif est calculée à partir de trois jeux de données expérimentales. Pour résoudre le problème d'optimisation non-linéaire avec contraintes, nous choisissons une méthode basée sur le gradient implémentée dans la fonction `fmincon` du logiciel Matlab™. Dans cette fonction, une évaluation du Hessien de la fonction de Lagrange est calculée à chaque itération. Simulink™ réalise le procédé de simulation. La programmation sous Matlab™ a été réalisée par S. Chenicker et supervisée par J-Ph Cassar dans le cadre de la collaboration avec le LAGIS.

### 5.3.5.2. STRATEGIE D'OPTIMISATION

Les paramètres du modèle sont au nombre de six :  $\mu_{max}$ ,  $K_S$ ,  $m_S$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans nos expériences, le nombre d'échantillons pour chaque expérience ne permet pas l'évaluation de tous les paramètres imposant la réduction de leur nombre. La culture se rapportant à un procédé carbone-limitant, les paramètres  $\mu$  et  $K_S$  sont corrélés. Estimer simultanément ces

deux paramètres n'est pas recommandé (Noykova *et al.*, 2002) (Patnaik, 1999). Par conséquent,  $K_s$  est fixé à  $0,015 \text{ g L}^{-1}$  qui est une valeur proche de  $0,010 \text{ g L}^{-1}$  obtenue pour le même substrat et la même espèce bactérienne (Martinez *et al.*, 1998). Les valeurs limites de la maintenance  $m_s$  sont définies selon des valeurs référencées de  $0,065$  (Monroy et De La Torre, 1996) et de  $0,12 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Sauer *et al.*, 1996). Ainsi, l'ensemble des paramètres à estimer a été réduit au sous-ensemble  $K_s$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ .

### 5.3.5.3. ÉVALUATION DE CONCENTRATION EN BIOMASSE DANS LA MOUSSE COLLECTÉE

La quantité de biomasse piégée en sortie de bioréacteur dans le collecteur de mousse,  $X_{col}$  est mesurée par la technique du poids sec. Cette technique nécessite un volume liquide  $V_{col}$  minimum de 10 mL. Par conséquent, la concentration en biomasse dans la mousse  $X_{out}$  n'est disponible qu'au bout d'un certain temps qui dépend du débit de sortie de la mousse  $f_{out}$ . Dans l'hypothèse où  $X_{out}$  est constant sur une période de temps  $[T_1, T_2]$ , il peut être estimé comme suit :

$$\hat{X}_{out}[t_1, t_2] = \frac{\Delta(V_{col} X_{col})_{[t_1, t_2]}}{\Delta(V_{col})_{[t_1, t_2]}}$$

Avec  $X_{col}$  la concentration en biomasse dans le collecteur à un temps  $t$  et  $V_{col}$  le volume de mousse liquéfiée dans le collecteur. La valeur de la concentration en biomasse dans le bioréacteur,  $X$ , à corrélérer avec  $\hat{X}_{out}[t_1, t_2]$  est représenté par la moyenne de  $X$  sur la période  $[t_1, t_2]$ . L'évolution de  $\hat{X}_{out}[t_1, t_2]$  en fonction de  $X$  est représentée sur la figure 80.

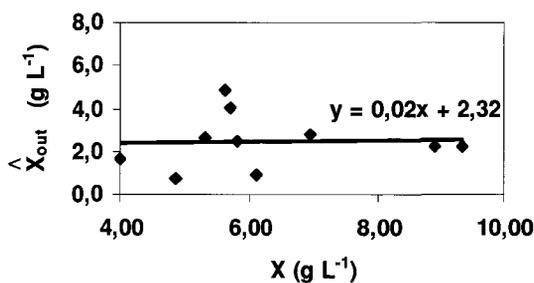


Figure 80 : Evolution de la concentration en biomasse dans la mousse collectée  $X_{out}$  (g/L) en fonction de la concentration moyenne en biomasse  $X$  (g/L) dans le bioréacteur.

La figure 80 montre une zone pseudo-constante de  $X_{out}$  dans une gamme de concentration de  $X$  comprise entre 4 et 10 g L<sup>-1</sup>. Une régression linéaire permet de déterminer les valeurs de  $\alpha$  et de  $\beta$ . Ainsi, pour une relation du type  $X_{out} = \alpha X + \beta$ , nous déterminons  $\alpha = 0,02$  et  $\beta = 2,32$  g L<sup>-1</sup>. La valeur proche de zéro de  $\alpha$  indique que la concentration en biomasse dans la mousse  $X_{out}$  est indépendante de la concentration en biomasse dans le bioréacteur  $X$ .

### 5.3.6. PERFORMANCE DE L'EXTRACTION DES LIPOPEPTIDES

Trois O-EFBC ont été opérés à différents taux d'alimentation. Les concentrations finales en lipopeptides dans le bioréacteur et dans le collecteur de mousse sont données dans le tableau 28.

Tableau 28 : Concentrations en mycosubtiline et surfactine exprimées (en mg/L<sup>1</sup>) dans le bioréacteur et le collecteur pour des O-EFBC opérés à différents taux d'alimentation  $1/\tau = 0,062$ ,  $1/\tau = 0,071$  et  $1/\tau = 0,086$  exprimés en h<sup>-1</sup>. ND : non détecté

	Collecteur de mousse		Bioréacteur	
	Mycosubtiline	Surfactine	Mycosubtiline	Surfactine
$1/\tau = 0,062 \text{ h}^{-1}$	155	10	1	ND
$1/\tau = 0,071 \text{ h}^{-1}$	210	13	2	1
$1/\tau = 0,086 \text{ h}^{-1}$	268	12	2	ND

La mycosubtiline et la surfactine se retrouvent exclusivement dans la mousse collectée. Le pourcentage d'extraction est proche de 100%.

### 5.3.7. ÉVALUATION DES PARAMETRES MODELES

La stratégie d'optimisation décrite au § 5.3.5.2. conduit à l'évaluation du sous-ensemble de paramètres  $\mu_{max}$ ,  $Y_{XS}$ ,  $\alpha$  et  $\beta$ . Les résultats sont donnés dans le tableau 29 pour  $K_S = 0,015$  g/L et pour les deux valeurs limites de  $m_s$  :

Tableau 29 : Estimation des paramètres du modèle,  $\mu^*_{max}$ ,  $Y^*_{X/S}$ ,  $\alpha^*$  and  $\beta^*$  déterminé pour  $K_S = 0,015$  g/L

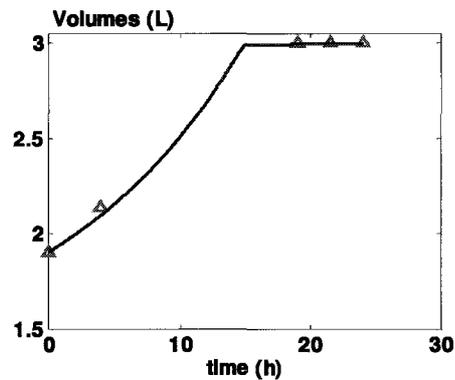
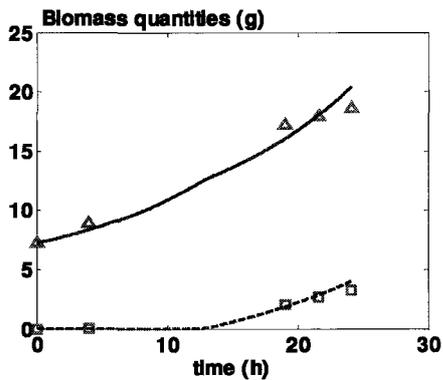
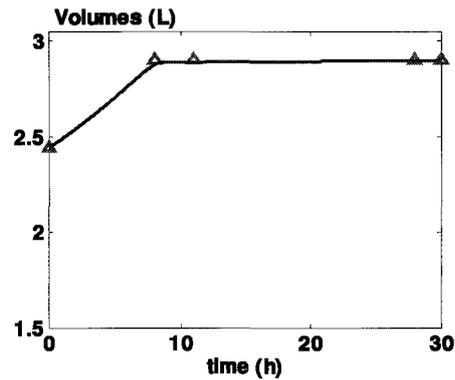
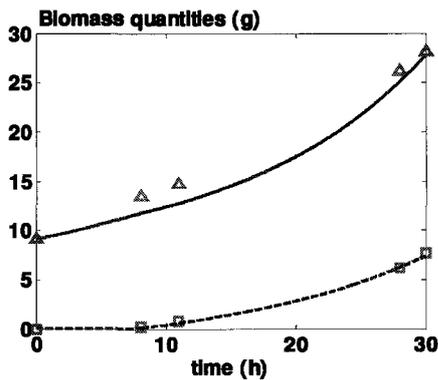
$m_s$	$\mu^*_{max}$	$Y^*_{X/S}$	$\alpha^*$	$\beta^*$
	(g L <sup>-1</sup> )	(g g <sup>-1</sup> )		
<b>0,065</b>	0,33	0,20	0,000	2,01
<b>0,12</b>	0,30	0,25	0,043	1,70

Pour une valeur de  $m_s$  égale à 0,12 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la valeur estimée de  $\beta$  est égale à 1,70 g/L ce qui est une valeur qui s'éloigne de celle de 2,32 g/L obtenue expérimentalement au § 5.3.5.3. Lorsque  $m_s$  égal à 0,065 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la valeur de  $\beta$  estimé atteint 2,01 g/L. Cette valeur est plus conforme aux résultats expérimentaux. Dans ce cas, la valeur estimée du  $\beta$  est nulle confirmant là aussi le résultat expérimental du § 5.3.5.3. Cette valeur nulle rend compte de l'indépendance entre la concentration en biomasse dans la mousse  $X_{out}$  et de la concentration en biomasse dans le bioréacteur  $X$ . La valeur du  $\mu_{max}$  estimé de 0,33 h<sup>-1</sup> est également très proche de la valeur de 0,35 h<sup>-1</sup> calculée pendant la phase  $I$  du processus. En conséquence, une valeur de  $m_s$  de 0,065 g g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a été choisie par la suite pour d'autres simulations.

La valeur de  $Y_{XS}$  estimée est égale à 0,20 g g<sup>-1</sup> ce qui est légèrement inférieur à ce qui était prévu après étude de la bibliographie. En cas de croissance de *B. subtilis* sur glucose, les auteurs rapportent généralement des valeurs s'étendant de 0,31 (Lee *et al.*, 1997a) (Lee *et al.*, 1997b) à 0,46 g g<sup>-1</sup> (Sauer *et al.*, 1996). La valeur basse du rendement de croissance sur glucose est synonyme d'un faible couplage énergétique. L'énergie générée par le catabolisme du glucose n'est pas utilisée de façon optimale pour la croissance. Dans notre cas, ce phénomène peut s'expliquer par deux facteurs principaux. Premièrement, la production d'acétate a été observée dans le milieu de culture ce qui représente une perte énergétique. En effet, le glucose n'est pas catabolisé totalement dans ce cas. Deuxièmement, la présence d'un substrat comme l'acide glutamique dans le milieu de culture peut mener à la conversion de l'acide pyruvique en acétoïne (Keynan *et al.*, 1954) représentant une perte supplémentaire potentielle d'énergie. Les mesures expérimentales faites précédemment dans notre laboratoire pendant des cultures discontinues de *B. subtilis* ATCC 6633 en fioles en

présence du glucose et d'acide glutamique ont permis le calcul d'une valeur de  $Y_{XS} = 0,22 \text{ g g}^{-1}$  proche de cette valeur estimée de  $0,20 \text{ g g}^{-1}$ .

Les quantités mesurées et estimées de biomasse dans le bioréacteur et dans le collecteur de mousse sont représentées sur la figure 81 (colonne de gauche). Les valeurs sont estimées en appliquant la stratégie d'optimisation avec  $m_s = 0,065 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  et  $K_S = 0,015 \text{ g/L}$ . L'écart type des erreurs résiduelles entre les données expérimentales et les valeurs de sortie du modèle est égal à  $0,83 \text{ g}$ . Il est à noter que l'erreur était de  $1,09 \text{ g}$  dans le cas des résultats simulés avec une  $m_s$  de  $0,12 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  confirmant notre choix d'une  $m_s$  de  $0,065 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .



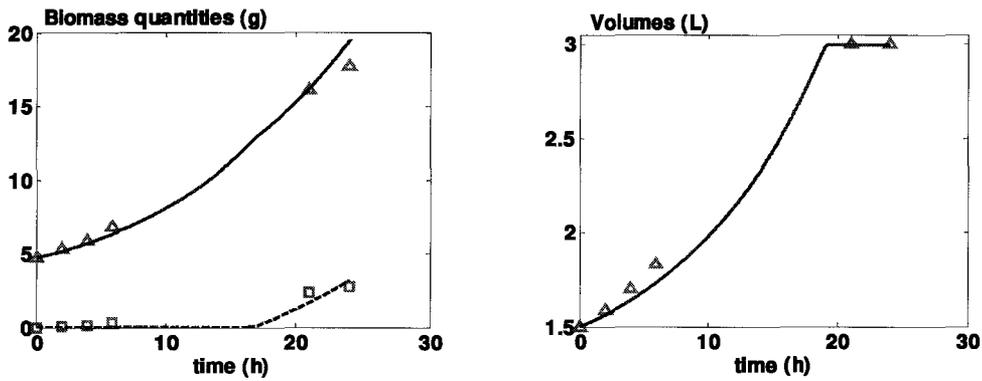


Figure 81 : Valeurs mesurées et simulées (ligne continue) de la quantité de biomasse et du volume dans le bioréacteur ( $\Delta$ ) et dans le collecteur de mousse ( $\square$ ), pour trois O-EFBC opérés à différents taux de dilution  $1/\tau=0,062$  (haut),  $1/\tau=0,071$  (milieu) and  $1/\tau=0,086$  (bas) exprimés en  $h^{-1}$ . La déviation standard de l'erreur résiduelle est 0,83 g. Ces valeurs sont simulées en utilisant  $\mu_{max}=0,33 h^{-1}$ ,  $Y_{XS}=0,20 g g^{-1}$ ,  $\alpha=0$  and  $\beta=2,01 g/L$ ,  $m_S=0,065 g g^{-1} h^{-1}$  et  $K_S=0,015 g/L$

L'évolution du volume mesuré dans le bioréacteur est représentée sur la figure 81 (colonne de droite). Il apparaît que l'estimation de ce volume au cours du temps est proche des valeurs mesurées, validant ainsi les deux hypothèses de travail émises au § 5.3.4.3.

**5.3.8. CORRELATION ENTRE LE TAUX DE CROISSANCE SPECIFIQUE MOYEN ET LA PRODUCTIVITE SPECIFIQUE**

La simulation de taux de croissance est faite et les courbes d'évolution au cours du temps sont données pour trois taux d'alimentation différents (figure 82) :

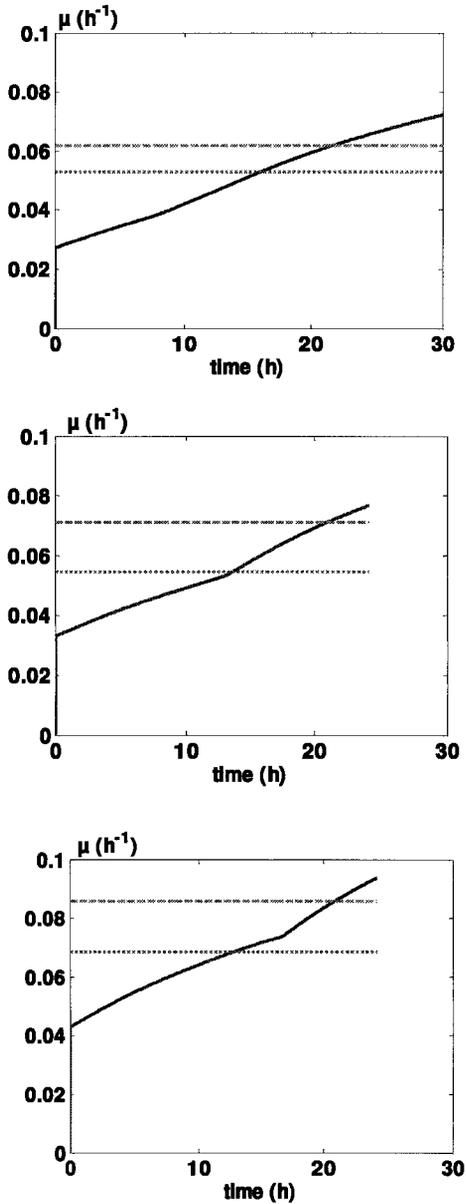


Figure 82 : Evolution du taux de croissance spécifique  $\mu$  (ligne continue), de la valeur moyenne  $\mu_{mean}$  (pointillé) et du taux de dilution  $1/\tau$  (ligne discontinue) pour trois O-EFBC opérés à différents taux de dilution  $1/\tau=0,062$  (haut),  $1/\tau=0,071$  (milieu) et  $1/\tau=0,086$  (bas) exprimés en  $h^{-1}$ . Ces valeurs sont simulées en utilisant  $\mu_{max}=0,33 h^{-1}$ ,  $Y_{XS}=0,20 g g^{-1}$ ,  $\alpha=0$  and  $\beta=2,01 g/L$ ,  $m_S=0,065 g g^{-1} h^{-1}$  et  $K_S = 0,015 g/L$ .

Durant la phase II du procédé où le moussage est négligeable, le taux de croissance spécifique  $\mu$  augmente pour atteindre la valeur limite égale à  $1/\tau$ . Les résultats représentés sur la figure 82 confirment que les valeurs moyennes des taux de croissance spécifiques  $\mu_{mean}$  sont inférieures aux  $\mu_{lim}$  pour chaque expérience. Le débordement de mousse apparaissant en phase III induit une augmentation de la pente de la courbe de  $\mu$  puis un dépassement de la valeur de  $1/\tau$ . Nous démontrons en annexe que la valeur limite du taux de croissance spécifique est plus grande que  $1/\tau$ . En effet cette valeur est égale à :

$$\mu_{lim} = \frac{1/\tau}{1 - \frac{X_{out}}{Y_{x/s} S_{in}}} + \frac{m_s}{\frac{S_{in}}{X_{out}} - \frac{1}{Y_{x/s}}}$$

Le modèle a été extrapolé à cinq expériences additionnelles menées à des taux d'alimentation de 0,008, 0,022, 0,040, 0,042 et 0,062  $h^{-1}$ . Des simulations sur les quantités de biomasse dans le bioréacteur et dans le collecteur de mousse ont été effectuées et l'écart-type des erreurs résiduelles était dans la gamme [1,09 g, 1,43 g]. Ces résultats ont permis ensuite de calculer des taux de croissance spécifique moyens qui ont été corrélées avec la productivité spécifique en mycosubtiline (figure 83).

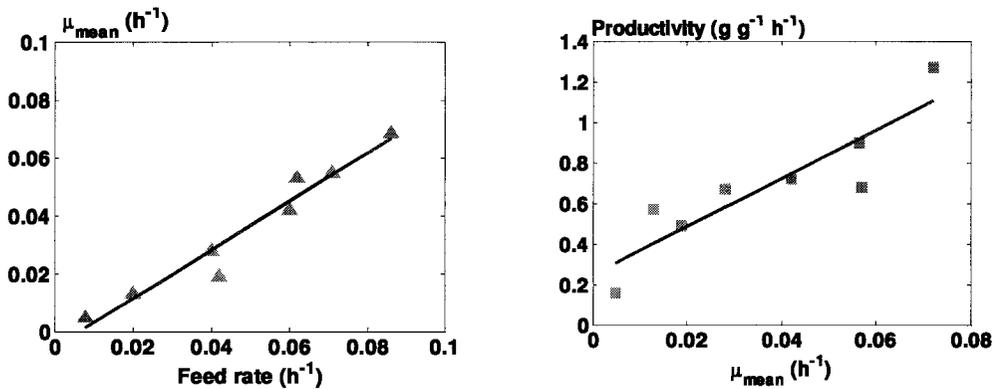


Figure 83 : Taux de croissance spécifique moyen  $\mu_{mean}$  en fonction du taux de dilution exprimés en  $h^{-1}$  (gauche). Productivité spécifique en mycosubtiline, exprimée en mg de mycosubtiline  $g^{-1} h^{-1}$ , en fonction du taux de croissance spécifique moyen  $\mu_{mean}$  exprimé en  $h^{-1}$  (droite).

La figure 83 (côté gauche) montre que la valeur moyenne du taux de croissance spécifique est une fonction linéaire du taux d'alimentation. La figure 83 (côté droit) de la phase III présente la productivité spécifique en mycosubtiline  $q_P$  en fonction des valeurs moyennes du taux de croissance spécifique  $\mu_{mean}$ . Elle montre que, dans la gamme des taux d'alimentation employée, la productivité peut être approchée grâce à une relation linéaire avec le taux de croissance spécifique moyen. Par conséquent, la productivité spécifique maximum en mycosubtiline correspond au taux de croissance maximum. La productivité spécifique en mycosubtiline est maximale pour le taux d'alimentation de  $0,086 \text{ h}^{-1}$ . Elle atteint une valeur de  $1,27 \text{ mg de mycosubtiline.g}^{-1} \text{ de biomasse.h}^{-1}$ .

### 5.3.9. EN BREF

L'O-EFBC est un procédé permettant de transformer le problème du moussage en un avantage. Nous avons pu extraire en continu la mycosubtiline avec un pourcentage d'extraction proche de 100%. L'existence d'une relation entre la concentration en biomasse dans le bioréacteur et dans le collecteur de mousse a été montrée expérimentalement et confirmée par un modèle original. L'évaluation de paramètres  $\mu_{max}$ ,  $Y_{XS}$ ,  $\alpha$  et  $\beta$  a permis la simulation des valeurs des quantités de biomasse  $VX$  dans le bioréacteur et  $V_{col}X_{col}$  dans le collecteur avec une déviation standard de 0,83 g. Après extrapolation du modèle à cinq expériences additionnelles, cette erreur est demeurée acceptable et comprise dans une fourchette [1,09 g, 1,43 g] démontrant la bonne capacité du modèle à prévoir le comportement de processus à différents taux d'alimentation. Ces calculs ont tous été réalisés avec des valeurs de  $K_S$  et  $m_S$  extraites d'une étude bibliographique.

Pour finir, la productivité spécifique de 1,27 de mycosubtiline  $\text{g}^{-1}$  de biomasse  $\text{h}^{-1}$  obtenue avec le taux d'alimentation de  $0,086 \text{ h}^{-1}$  est meilleure que n'importe quelle autre productivité déterminée dans des cultures en mode discontinu de *B. subtilis* BBG100 (Leclère *et al.*, 2005).

### 5.3.10. VALORISATION DES RESULTATS

Les résultats présentés dans le § 5.3. ont été obtenus conjointement par ProBioGEM et le LAGIS dans le cadre d'une collaboration. Ils ont fait l'objet d'un article publié dans le «Journal of Biotechnology » en 2007.

### 5.4. PROCEDE DEBORDANT SEMI-DISCONTINU ALIMENTE LINEAIREMENT (O-FBC)

Basée sur une procédure de travail similaire à l'O-EFBC, une stratégie d'alimentation à débit constant est testée afin de se rapprocher d'un fonctionnement à recyclage partiel classique (figure 84).

Les cellules sont cultivées 17 h dans une culture en mode discontinu en phase *I*. La vitesse d'agitation augmente progressivement pour maintenir le taux d'oxygène dissous au-dessus de 15 % de la concentration de saturation jusqu'à ce que la source principale de carbone ait été épuisée. Dans la phase *I*, le volume  $V$  de milieu dans le bioréacteur diminue de façon dramatique en raison du débordement de mousse dû à la production constitutive du mycosubtiline. En effet, plus de 90 % du volume de culture déborde durant cette phase.

Dans la phase *II*, appelée phase transitoire, le bioréacteur est dans un premier temps alimenté à raison de 270 mL/h de sorte à retrouver plus rapidement le volume  $V$  de stabilisation de la phase *III*. Dans un deuxième temps, le débit est fixé à la valeur de 150 mL/h.

La phase *III* correspond à un mode de fonctionnement à volume  $V$  constant égal à 3 L où le débit de débordement de mousse devient égal au débit d'alimentation. Durant cette phase, le débit d'alimentation  $f_{in}$  est conservé égal à 150 mL/h et correspond à un taux de dilution  $D$  de  $0,050 \text{ h}^{-1}$ .

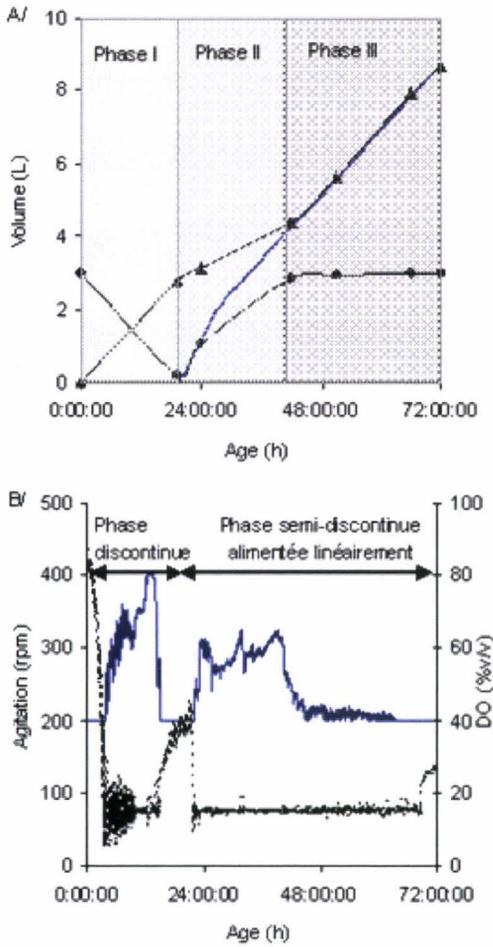


Figure 84 : (A) Evolution du volume  $V$  dans le bioréacteur ( $-\bullet-$ ), du volume  $V_{col}$  dans le collecteur de mousse ( $-\blacktriangle-$ ) et du volume d'alimentation cumulé ( $-$ ). La phase I représente la phase discontinue, la phase II la phase transitoire de l'O-FBC et la phase III la phase à volume  $V$  constant. Les phases I et II sont menées à volume  $V$  non constant. (B). Evolution de la vitesse d'agitation et du pourcentage de saturation en oxygène dissous durant une culture débordante de *B. subtilis* BBG100 menée à  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH}=6,5$  et à un taux de dilution  $1/\tau=0,050\text{ h}^{-1}$ .

L'évolution du pH dans le bioréacteur représentée sur la figure 85 permet de vérifier que la régulation s'effectue correctement à la valeur de consigne de 6,5 u.pH. Dans le collecteur de mousses, nous observons une légère diminution au cours du temps jusqu'à une

valeur de 6,3 u.pH. Cette variation de pH est limitée grâce au refroidissement du collecteur par des poches de gel eutectique qui sont renouvelées par tranche de 12 h. Ce refroidissement est nécessaire pour stopper la croissance anarchique des microorganismes entraînés par la mousse et par conséquent pour la bonne conservation de la mycosubtiline produite.

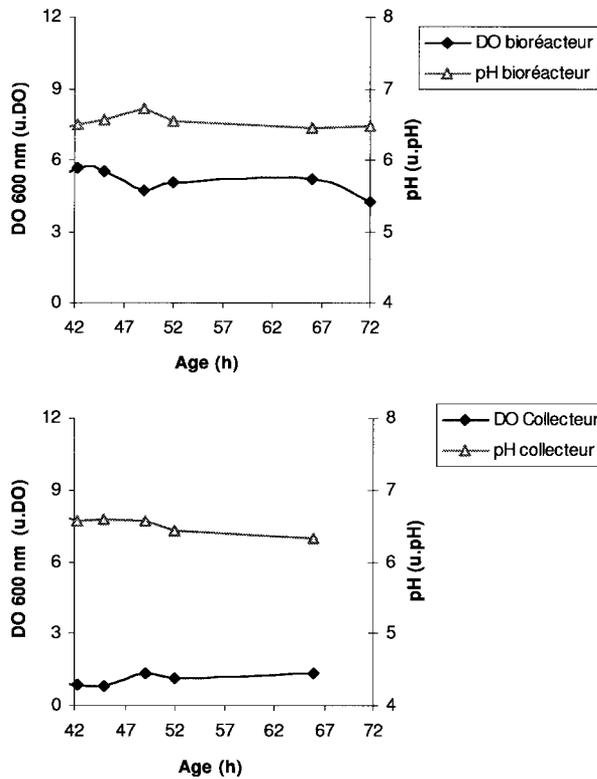


Figure 85 : Evolution de la DO 600 nm (—◆—) et du pH (—▲—) dans le bioréacteur (haut) et le collecteur de mousse (bas) durant la phase III d'une culture débordante de *B. subtilis* BBG100 menée à 30°C, pH=6,5 et à un taux de dilution  $1/\tau=0,050\text{ h}^{-1}$ .

L'évolution de la biomasse dans le bioréacteur et dans le collecteur est quasi-constante entre 42 et 66 h. Elle avoisine 5,0 DO dans le bioréacteur et 1,2 DO dans le collecteur. Ce résultat se rapproche du résultat escompté dans le cadre d'un procédé opéré à volume constant, à alimentation constante et où le recyclage est dit « partiel » (figure 86). Ce type de procédé permet de maintenir le taux de croissance spécifique  $\mu$  constant lorsque le système est

à l'équilibre. Ce dernier est obtenu lorsque la concentration en biomasse est constante dans le bioréacteur.

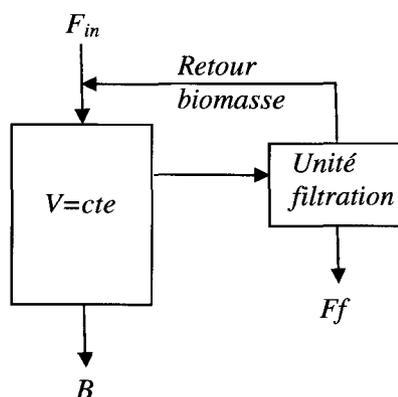


Figure 86 : Diagramme d'une culture continue à recyclage partiel.  $F_{in} = B + F_f$

Dans le cas de l'O-FBC,  $B = 0,24.F_{in}$ , soit 36 mL/h. Dans l'hypothèse où l'O-FBC se rapporte à une culture continue à recyclage partiel, le taux de croissance spécifique du microorganisme est égal à  $\mu = B/V$ , soit  $0,012 \text{ h}^{-1}$ .

La productivité spécifique  $q_P$  en mycosubtiline mesurée durant la phase *III* est d'environ  $0,20 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Cette productivité est obtenue pour une valeur du taux de dilution de  $0,050 \text{ h}^{-1}$  correspondant à un taux de croissance spécifique de  $0,012 \text{ h}^{-1}$ . Comparée à la productivité spécifique obtenue à taux de croissance spécifique de  $0,012 \text{ h}^{-1}$  en O-EFBC, soit  $0,35 \text{ mg de mycosubtiline.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , cette productivité est inférieure.

## 5.5. CONCLUSION

L'efficacité des antimousses a été montrée pour limiter la formation de la mousse générée par la mycosubtiline mais le dosage des lipopeptides présente des difficultés réelles en présence de ces antimousses. Dans ce contexte, la mise au point d'un procédé permettant de transformer le problème du moussage en un avantage a permis l'extraction en continu de la mycosubtiline avec un pourcentage d'extraction proche de 100%. Grâce à ce procédé, appelé O-EFBC, une productivité spécifique de  $1,27 \text{ de mycosubtiline g}^{-1} \text{ de biomasse h}^{-1}$  obtenue avec le taux d'alimentation de  $0,086 \text{ h}^{-1}$  a été obtenue. Cette valeur est meilleure que n'importe

quelle autre productivité déterminée dans des cultures en mode discontinu de *B. subtilis* BBG100. Le procédé O-FBC présente quant à lui l'avantage de pouvoir être prolongé dans le temps puisqu'il se rattache à un procédé continu à recyclage partiel. La productivité en mycosubtiline obtenue avec ce procédé est cependant plus faible que celle obtenue avec l'O-EFBC.

## **6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## 6. CONCLUSION

La mycosubtiline est connue pour être le lipopeptide iturinique au pouvoir antifongique le plus important. Cette famille de composé se décline au travers d'une multitude d'homologues (longueur de la chaîne hydrocarbonée et type d'acide aminé constitutif) et d'isomères (*n-*, *iso* ou *anteiso*). La première étape du travail présenté dans la thèse a confirmé le large spectre d'action antifongique et mis en évidence les différences d'activité des multiples isoformes. Cette étude a montré que la longueur de la chaîne carbonée de l'acyl n'est pas le seul paramètre impliqué dans l'activité antifongique des iturines. Une étude sur l'effet de la longueur de la chaîne et de l'isomérisation des iturines A avait en effet montré que l'activité antifongique était d'autant plus élevée que la chaîne était longue (Hbid, 1996). Nos résultats sont originaux puisqu'ils montrent que l'isomérisation de la mycosubtiline joue un rôle très important dans le pouvoir antifongique : l'isoforme *anteisoC-17* présente une CMI de 8  $\mu\text{M}$  vis-à-vis de *B. cinerea* alors que l'isoforme *isoC-17* présente seulement une CMI de 26  $\mu\text{M}$ .

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, peu de résultats ont été obtenus par le passé concernant la biosynthèse de lipopeptides par la souche ATCC 6633, probablement en raison des faibles niveaux de production de lipopeptides obtenues jusque-là par les différents auteurs. L'étude de paramètres de culture réalisée dans la thèse a permis de mieux appréhender la complexité de la physiologie de *B. subtilis* ATCC 6633. Un ensemble de conditions environnementales, permettant à la fois l'obtention quantitative de mycosubtilines et sélective de mycosubtiline *anteisoC-17*, a été défini. Le choix du milieu de Landy a dans un premier temps permis de favoriser la synthèse des mycosubtilines par rapport à celle des surfactines. Puis l'étude de l'effet du pH a montré que la production de mycosubtiline pouvait être augmentée en utilisant du milieu de Landy tamponné par du MOPS 100 mM à pH 7.0. L'étude originale réalisée en fioles RAMOS de l'effet du transfert d'oxygène a ensuite permis de montrer l'importance de ce paramètre pour la productivité de la synthèse de mycosubtiline.

L'étude des conditions de culture a par la suite montré qu'en présence d'isoleucine, la production de mycosubtiline par ATCC 6633 et une souche dérivée, surproductrice constitutive de mycosubtiline, appelée BBG100, pouvait être orientée vers l'isoforme la plus active, l'isoforme *anteisoC-17*, sans perte de productivité. Il a été récemment démontré que l'activation de l'acyl puis le chargement de l'acyl-adénylate par le domaine AL de la mycosubtiline synthétase n'était pas spécifique de la longueur de sa chaîne carbonée, lorsque celle-ci est comprise entre C-10 et C-16 (Hansen *et al.*, 2007). Si l'on se réfère à ces travaux récents, l'orientation de la synthèse de mycosubtiline vers l'isoforme *anteisoC-17* obtenue en présence d'isoleucine pourrait être liée à l'augmentation du pool d'acides gras branché *anteiso*, impliquant par conséquent le métabolisme central de *B. subtilis* et ses régulations.

Les régulations métaboliques intervenant chez un microorganisme producteur de mycosubtiline n'avait jamais été étudié jusque là en transcriptomique. Seuls Duitman *et al.* (2007) ont mis en évidence, récemment, le rôle du régulateur de la transcription AbrB dans ces mécanismes. En effet, un mutant de *B. subtilis* ATCC 6633  $\Delta$ *abrB* a permis d'augmenter par un facteur 5 l'expression du gène *myc* codant pour la mycosubtiline synthétase. Notre travail a consisté à analyser de façon globale la réponse transcriptomique de *B. subtilis* ATCC 6633 dans des conditions de culture permettant d'étudier l'aspect sélectivité de la biosynthèse de mycosubtiline et garantissant un niveau de productivité suffisant pour faciliter l'analyse. Ce dernier aspect a pu être obtenu en utilisant la souche BBG100 surproductrice constitutive de mycosubtiline. Cette étude a permis de mettre en évidence chez *B. subtilis* BBG100 une cinquantaine de gènes régulés, parmi lesquels *abrB*, lors de cultures réalisées en présence d'isoleucine.

Les hypothèses sur les mécanismes de régulation de la fourniture en précurseurs branchés chez *B. subtilis* ont rendu compte de la complexité des phénomènes en jeu. Le gène *ybgE*, dont la répression en présence d'isoleucine aurait pour effet de limiter la synthèse des acides aminés branchés tels que la valine ou la leucine, pourrait aussi limiter le pool d'acide gras branchés de type *iso* au profit d'acide gras branchés *anteiso*. Afin d'assurer la prise en charge des acides aminés branchés par la machinerie ribosomale, la cellule a contre-balançé l'effet de *ybgE* en sur-exprimant *leuS*, *bfmBAA* ainsi que l'opéron *ilvBNClouABCD*.

Nos travaux suggèrent un rôle du répresseur pléiotropique de la transcription CodY dans la régulation de ce mécanisme d'obtention du phénotype [mycosubtiline *anteisoC-17<sup>+++</sup>*]. L'analyse de cette régulation est rendue plus complexe encore par l'implication du tandem de régulateurs AbrB/ComK. De plus, nous avons montré que les gènes *cspB* et *cspC* codant pour des protéines de choc thermique froid, réprimés de façon tardive en présence d'isoleucine, pourraient eux aussi être impliqués dans l'augmentation du pool d'acides gras branchés *anteiso*. Des expériences en fioles RAMOS ont montré que la souche *B. subtilis* ATCC 6633 semblait pouvoir résister à un choc froid. Un mécanisme encore inconnu permettrait donc d'augmenter la formation d'acides gras branchés de type *anteiso* nécessaire à l'adaptation au froid. L'apport d'isoleucine se substituant à ce mécanisme aurait pour effet de réprimer les *csp* rendant compte par conséquent de la participation des *csp* à ce mécanisme de régulation. Ce mécanisme qui favoriserait la formation d'acides gras branchés de type *anteiso* pourrait par la suite être provoqué en sur-exprimant chez ATCC 6633 les gènes *csp*, ce qui permettrait de retirer l'isoleucine du milieu de culture en vue d'une éventuelle industrialisation.

Compte tenu des difficultés à extraire les lipopeptides à partir d'un moût de fermentation (Isa *et al.*, 2007), la mise au point d'un procédé en bioréacteur permettant d'extraire en continu la mycosubtiline a été réalisée. Ce procédé, appelé O-EFBC, a permis l'extraction en continu de la mycosubtiline avec un pourcentage d'extraction proche de 100% et l'obtention d'une productivité spécifique de 1,27 de mycosubtiline g<sup>-1</sup> de biomasse h<sup>-1</sup>. Cette valeur est meilleure que n'importe quelle autre productivité en mycosubtiline déterminée dans des cultures en bioréacteur avec *B. subtilis*. Afin d'améliorer encore cette, productivité, en vue d'une éventuelle industrialisation, une étude favorisant le moussage, en utilisant des mobiles d'agitation différents des turbines de Rushton, pourrait être envisagée. Elle permettrait notamment d'augmenter les taux de dilution appliqués au volume réactionnel. La perspective de développement et de modélisation du procédé O-FBC, qui se réfère à un procédé avec recyclage partiel de la biomasse, permettrait de produire la mycosubtiline en continu.

## LISTE DES REFERENCES

1. Akpa,E., Jacques,P., Wathelet,B., Paquot,M., Fuchs,R., Budzikiewicz,H., Thonart,P., 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. Appl. Biochem. Biotechnol. 91-93, 551-561.
2. Anderlei,T., Büchs,J., 2001. Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. Biochem. Eng. J. 7, 157-162.
3. Aron,Z.D., Dorrestein,P.C., Blackhall,J.R., Kelleher,N.L., Walsh,C.T., 2005. Characterization of a new tailoring domain in polyketide biogenesis: the amine transferase domain of MycA in the mycosubtilin gene cluster. J. Am. Chem. Soc. 127, 14986-14987.
4. Aron,Z.D., Fortin,P.D., Calderone,C.T., Walsh,C.T., 2007. FenF: servicing the Mycosubtilin synthetase assembly line in trans. Chembiochem. 8, 613-616.
5. Barna,J.C., Williams,D.H., 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. Annu Rev Microbiol 38, 339-357.
6. Baumgart,F., Kluge,B., Ullrich,C., Vater,J., Ziessow,D., 1991. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. Biochem Biophys. Res. Commun. 177, 998-1005.
7. Bazill,G.W., Karamata,D., 1972. Temperature-sensitive mutants of *B. subtilis* defective in deoxyribonucleotide synthesis. Molec. Gen. Genet. 117, 19-29.
8. Beckering,C.L., Steil,L., Weber,M.H.W., Iker,U., Marahiel,M.A., 2002. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 184, 6395-6402.
9. Berger,B.J., English,S., Chan,G., Knodel,M.H., 2003. Methionine regeneration and aminotransferases in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 185, 2418-2431.
10. Bertucci,F., Bernard,K., Loriod,B., Chang,Y.C., Granjeaud,S., Birnbaum,D., Nguyen,C., Peck,K., Jordan,B.R., 1999. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. Hum. Mol. Genet. 8, 1715-1722.
11. Besson,F., Chevanet,C., Michel,G., 1987a. Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 133, 767-772.

12. Besson,F., Hourdou,M.L., 1987. Effect of amino acids on the biosynthesis of  $\beta$ -amino acids, constituents of bacillomycins F. J. Antibiot. 40, 221-223.
13. Ye,R.W., Tao,W., Bedzyk,L., Young,T., Chen,M., Li,L., 2000. Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. J. Bacteriol. 182, 4458-4465.
14. Besson,F., Michel,G., 1987. Isolation and characterization of new iturins: iturin D and iturin E. J. Antibiot. (Tokyo) 40, 437-442.
15. Besson,F., Michel,G., 1989. Action of mycosubtilin, an antifungal antibiotic of *Bacillus subtilis*, on the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios 59, 113-121.
16. Besson,F., Michel,G., 1990. Mycosubtilins B and C: minor antibiotics from mycosubtilin-producer *Bacillus subtilis*. Microbios 62, 93-99.
17. Besson,F., Peypoux,F., Michel,G., 1978a. Action of mycosubtilin and of bacillomycin L on *Micrococcus luteus* cells and protoplasts: influence of the polarity of the antibiotics upon their action on the bacterial cytoplasmic membrane. FEBS Lett. 90, 36-40.
18. Besson,F., Peypoux,F., Michel,G., Delcambe,L., 1978b. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. J. Antibiot. (Tokyo) 31, 284-288.
19. Besson,F., Peypoux,F., Michel,G., Delcambe,L., 1979. Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. J. Antibiot. (Tokyo) 32, 828-833.
20. Besson,F., Quentin,M.J., Michel,G., 1989. Action of mycosubtilin on erythrocytes and artificial membranes. Microbios 59, 137-143.
21. Besson,F., Tenoux,I., Hourdou,M.L., Michel,G., 1992. Synthesis of beta-hydroxy fatty acids and beta-amino fatty acids by the strains of *Bacillus subtilis* producing iturinic antibiotics. Biochim. Biophys. Acta 1123, 51-58.
22. Bishop,D.G., Rutberg,L., Samuelsson,B., 1967. The chemical composition of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. Eur J Biochem 2, 448-453.
23. Bonmatin,J.M., Genest,M., Labbe,H., Ptak,M., 1994. Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by <sup>1</sup>H-NMR, distance geometry, and molecular dynamics. Biopolymers 34, 975-986.
24. Bonmatin,J.M., Laprevote,O., Peypoux,F., 2003. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. Comb. Chem. High Throughput. Screen. 6, 541-556.

25. Byford, M.F., Baldwin, J.E., Shiau, C.Y., Schofield, C.J., 1997. The mechanism of ACV synthetase. *Chem. Rev.* 97, 2631-2649.
26. Caillon, J., Juvin, M.E., Pirault, J.L., Drugeon, H.B., 1989. Bactericidal effect of daptomycin (LY 146032) compared with vancomycin and teicoplanin against gram-positive bacteria. *Pathol. Biol. (Paris)* 37, 540-548.
27. Chevanet, C., Besson, F., Michel, G., 1986. Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*. *Can J Microbiol* 32, 254-258.
28. Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J., Kosaric, N., 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol* 42, 408-412.
29. Davis, D.A., Lynch, H.C., Varley, J., 2001. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 346-354.
30. Debarbouillé, M., Gardan, R., Arnaud, M., Rapoport, G., 1999. Role of *bkdR*, a transcriptional activator of the SigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 2059-2066.
31. Delcambe, L., Peypoux, F., Besson, F., 1977. Structure of iturin and iturin like substances. *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1122-1124.
32. Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47-64.
33. Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J., 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13294-13299.
34. Duitman, E.H., Wyczawski, D., Boven, L.G., Venema, G., Kuipers, O.P., Hamoen, L.W., 2007. Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3490-3496.
35. Eshita, S.M., Roberto, N.H., Beale, J.M., Mamiya, B.M., Workman, R.F., 1995. Bacillomycin Lc, a new antibiotic of the iturin group: isolations, structures, and antifungal activities of the congeners. *J. Antibiot. (Tokyo)* 48, 1240-1247.
36. Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C., Gocayne, J.D., Scott, J., Shirley, R., Liu, L.I., Venter, J.C., 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* 269, 496-521.

37. Gao,C., Feng,E., Wang,Z., Xiu,Z., 2005. Parameters identification problem of the nonlinear dynamical system in microbial continuous cultures. *Appl Math Comput* (New York) 169, 476-484.
38. Garbay-Jaureguiberry,C., Roques,B.P., Delcambe,L., 1978. NMR conformational study of iturin A, an antibiotic from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett.* 93, 151-156.
39. Gehring,A.M., DeMoll,E., Fetherston,J.D., Mori,I., Mayhew,G.F., Blattner,F.R., Walsh,C.T., Perry,R.D., 1998. Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* 5, 573-586.
40. Genest,M., Marion,D., Caille,A., Ptak,M., 1987. Modelling and refinement of the conformation of mycosubtilin in solution from two-dimensional NMR data. *Eur. J. Biochem.* 169, 389-398.
41. Genest,M., Marion,D., Ptak,M., 1985. Calculations of the conformations of Iturin A in relation with NMR studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2, 849-857.
42. Grangemard,I., Peypoux,F., Wallach,J., Das,B.C., Labbe,H., Caille,A., Genest,M., Maget-Dana,R., Ptak,M., Bonmatin,J.M., 1997. Lipopeptides with improved properties: structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins. *J Pept. Sci.* 3, 145-154.
43. Graumann,P.L., Marahiel,M.A., 1999. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch. Microbiol* 171, 135-138.
44. Grundy,F.J., Waters,D.A., Takova,T.Y., Henkin,T.M., 1993. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 10, 259-271.
45. Grunewald,J., Marahiel,M.A., 2006. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 121-146.
46. Hamoen,L.W., Kausche,D., Marahiel,M.A., Van Sinderen,D., Venema,G., Serror,P., 2003. The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of comK. *FEMS Microbiol. Lett.* 218, 299-304.
47. Hansen,D.B., Bumpus,S.B., Aron,Z.D., Kelleher,N.L., Walsh,C.T., 2007. The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 6366-6367.
48. Harnois,I., Maget-Dana,R., Ptak,M., 1989. Methylation of the antifungal lipopeptide iturin A modifies its interaction with lipids. *Biochimie* 71, 111-116.
49. Hartig,E., Hartmann,A., Shatzle,M., Albertini,A.M., Jahn,D., 2006. The *Bacillus subtilis nrdEF* genes, encoding a class Ib ribonucleotide reductase, are essential for aerobic and anaerobic growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5260-5265.

50. Hbid,Ch. Contribution à l'étude de la relation entre la structure des lipopeptides de *Bacillus subtilis* et leurs activités hémolytique et antifongique. Th : Chim : Liège : Belgique. 151 p. 29-10-1996.  
Ref Type: Thesis/Dissertation
51. Hourdou,M.L., Besson,F., Tenoux,I., Michel,G., 1989. Fatty acid and beta-amino acid syntheses in strains of *Bacillus subtilis* producing iturinic antibiotics. *Lipids* 24, 940-944.
52. Isa,M.H.M., Coraglia,D.E., Frazier,R.A., Jauregi,P., 2007. Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. *J. Membr. Sci.* 296, 51-57.
53. Jacques,P., Hbid,C., Destain,J., Razafindralambo,H., Paquot,M., De Pauw,E., Thonart,P., 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 Plackett-Burman design. *Appl. Biochem. Biotechnol. Part A Enzyme Eng. Biotechnol.* 77-79, 223-233.
54. Kaan,T., Homuth,G., Mader,U., Bandow,J., Schweder,T., 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* 148, 3441-3455.
55. Kakinuma,A., Tamura,G., Arima,K., 1968. Wetting of fibrin plate and apparent promotion of fibrinolysis by surfactin, a new bacterial peptidelipid surfactant. *Experientia* 24, 1120-1121.
56. Kaneda,T., 1963. Biosynthesis of branched chain fatty acids. II. Microbial synthesis of branched long chain fatty acids from certain short chain fatty acid substrates. *J. Biol. Chem.* 238, 1229-1235.
57. Kaneda,T., 1966. Biosynthesis of branched-chain fatty acids. IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by *Bacillus subtilis*. *Can J Microbiol* 12, 501-514.
58. Kaneda,T., 1967. Fatty acids in the genus *Bacillus*. I. *Iso-* and *anteiso-*fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J. Bacteriol.* 93, 894-903.
59. Kaneda,T., 1968. Fatty acids in the genus *Bacillus*. II. Similarity in the fatty acid compositions of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 95, 2210-2216.
60. Kaneda,T., 1973. Biosynthesis of branched long-chain fatty acids from the related short-chain -keto acid substrates by a cell-free system of *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol* 19, 87-96.
61. Kaneda,T., 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: An example of branched chain preference. *Bacteriol. rev.* 41, 391-418.

62. Kaneda, T., Smith, E.J., 1980. Relationship of primer specificity of fatty acid de novo synthetase to fatty acid composition in 10 species of bacteria and yeasts. *Can. J. Microbiol* 26, 893-898.
63. Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T., 2000. Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry* 39, 15513-15521.
64. Keynan, A., Strecker, H.J., Waelsch, H., 1954. Glutamine, glutamic acid and glycolysis in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 223, 47-51.
65. Kim, P.I., Bai, H., Bai, D., Chae, H., Chung, S., Kim, Y., Park, R., Chi, Y.T., 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol* 97, 942-949.
66. Klein, W., Weber, M.H., Marahiel, M.A., 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* 181, 5341-5349.
67. Klich, M.A., Lax, A.R., Bland, J.M., 1991. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 116, 77-80.
68. Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., 2001. Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* 40, 7099-7108.
69. Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A. *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.
70. Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B., Colio, L.G., 1948. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67, 530-541.
71. Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G., 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modifications of membrane permeability and lipid composition. *J. Antibiot. (Tokyo)* 40, 1588-1595.
72. Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G., 1990. Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: influence of the sterol membrane composition. *Can. J. Microbiol* 36, 384-389.
73. Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G., Genet, R., Morgat, J.L., 1986. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 856, 526-535.

74. Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4577-4584.
75. Lee, J., Goel, A., Atai, M.M., Domach, M.M., 1997a. Supply-side analysis of growth of *Bacillus subtilis* on glucose-citrate medium: Feasible network alternatives and yield optimality. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 710-718.
76. Lee, J., Goel, A., Atai, M.M., Domach, M.M., 1997b. Erratum: Supply-side analysis of growth of *Bacillus subtilis* on glucose-citrate medium: Feasible network alternatives and yield optimality (*Applied and Environmental Microbiology* (1997) 63:2 (714)). *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2109.
77. Lee, Y.K., Kim, S.B., Park, C.S., Kim, J.G., Oh, H.M., Yoon, B.D., Kim, H.S., 2005. Chromosomal integration of *sfp* gene in *Bacillus subtilis* to enhance bioavailability of hydrophobic liquids. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 789-794.
78. Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14, 1675-1680.
79. Mader, U., Hennig, S., Hecker, M., Homuth, G., 2004. Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the *Bacillus subtilis* branched-chain amino acid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 186, 2240-2252.
80. Mader, U., Homuth, G., Scharf, C., ttner, K., Bode, R., Hecker, M., 2002. Transcriptome and proteome analysis of *Bacillus subtilis* gene expression modulated by amino acid availability. *J. Bacteriol.* 184, 4288-4295.
81. Maget-Dana, R., Ptak, M., 1990. Iturin lipopeptides: interactions of mycosubtilin with lipids in planar membranes and mixed monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 34-40.
82. Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., Ptak, M., 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74, 1047-1051.
83. Maier, U., Büchs, J., 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.* 7, 99-106.
84. Marion, D., Genest, M., Caille, A., Peypoux, F., Michel, G., Ptak, M., 1986. Conformational study of bacterial lipopeptides: refinement of the structure of iturin A in solution by two-dimensional <sup>1</sup>H-NMR and energy calculations. *Biopolymers* 25, 153-170.
85. Marques, M.A., Citron, D.M., Wang, C.C., 2007. Development of Tyrocidine A analogues with improved antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.*

86. Martinez,A., Ramirez,O.T., Valle,F., 1998. Effect of growth rate on the production of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fedbatch cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 520-526.
87. May,J.J., Wendrich,T.M., Marahiel,M.A., 2001. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* 276, 7209-7217.
88. Miethke,M., Westers,H., Blom,E.J., Kuipers,O.P., Marahiel,M.A., 2006. Iron starvation triggers the stringent response and induces amino acid biosynthesis for bacillibactin production in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 8655-8657.
89. Molle,V., Nakaura,Y., Shivers,R.P., Yamaguchi,H., Losick,R., Fujita,Y., Sonenshein,A.L., 2003. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator *codY* identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J. Bacteriol.* 185, 1911-1922.
90. Monroy,M., De La Torre,M., 1996. Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL.* 45, 546-550.
91. Mootz,H.D., Schwarzer,D., Marahiel,M.A., 2002. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem.* 3, 490-504.
92. Mossialos,D., Ochsner,U., Baysse,C., Chablain,P., Pirnay,J.P., Koedam,N., Budzikiewicz,H., ndez,D.U., fer,M., Ravel,J., Cornelis,P., 2002. Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *Pseudomonas* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* 45, 1673-1685.
93. Muller,W.E.G., Geisert,M., Zahn,R.K., 1983. Potentiation of the cytostatic effect of bleomycin on L5178y mouse lymphoma cells by pepleomycin. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 665-670.
94. Nakano,M.M., Zuber,P., 1991. The primary role of *comA* in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of *srfA*. *J. Bacteriol.* 173, 7269-7274.
95. Neu,T.R., Poralla,K., 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 521-525.
96. Noykova,N., Iler,T.G., Gyllenberg,M., Timmer,J., 2002. Quantitative analyses of anaerobic wastewater treatment processes: Identifiability and parameter estimation. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 89-103.

97. Osman, M., Høiland, H., Holmsen, H., Ishigami, Y., 1998. Tuning micelles of a bioactive heptapeptide biosurfactant via extrinsically induced conformational transition of surfactin assembly. *J. Pept. Sci.* 4, 449-458.
98. Patnaik, P.R., 1999. Transient sensitivity analysis of a cybernetic model of microbial growth on two substrates. *Bioprocess Eng.* 21, 135-140.
99. Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., 1978. Structure of iturin C from *Bac. subtilis*. *Tetrahedron* 34, 1147-1152.
100. Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Delcambe, L., 1979. Preparation and antibacterial activity upon *Micrococcus luteus* of derivatives of iturin A, mycosubtilin and bacillomycin L, antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 32, 136-140.
101. Peypoux, F., Besson, F., Michel, G., Lenzen, C., Dierickx, L., Delcambe, L., 1980. Characterization of a new antibiotic of iturin group: bacillomycin D. *J. Antibiot. (Tokyo)* 33, 1146-1149.
102. Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Das, B.C., Ptak, M., Michel, G., 1991. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. *Eur J Biochem* 202, 101-106.
103. Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Grangemard, I., Das, B.C., Ptak, M., Wallach, J., Michel, G., 1994. [Ala4] surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *Eur J Biochem* 224, 89-96.
104. Peypoux, F., Marion, D., Maget-Dana, R., Ptak, M., Das, B.C., Michel, G., 1985. Structure of bacillomycin F, a new peptidolipid antibiotic of the iturin group. *Eur. J. Biochem.* 153, 335-340.
105. Peypoux, F., Pommier, M.T., Das, B.C., Besson, F., Delcambe, L., Michel, G., 1984. Structures of bacillomycin D and bacillomycin L peptidolipid antibiotics from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 37, 1600-1604.
106. Peypoux, F., Pommier, M.T., Marion, D., Ptak, M., Das, B.C., Michel, G., 1986. Revised structure of mycosubtilin, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 39, 636-641.
107. Phae, C.G., Shoda, M., 1991. Investigation of optimal conditions for foam separation of iturin, an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 118-121.
108. Pusey, P.L., Wilson, C.L., 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68, 753-756.
109. Quentin, M.J., Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., 1982. Action of peptidolipidic antibiotics of the iturin group on erythrocytes. Effect of some lipids on hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 684, 207-211.

110. Ratnayake-Lecamwasam,M., Serror,P., Wong,K.W., Sonenshein,A.L., 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* 15, 1093-1103.
111. Razafindralambo,H., Paquot,M., Baniel,A., Popineau,Y., Hbid,C., Jacques,P., Thonart,P., 1996. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *JAOCS J Am Oil Chem Soc* 73, 149-151.
112. Razafindralambo,H., Popineau,Y., Deleu,M., Hbid,C., Jacques,P., Thonart,P., Paquot,M., 1998. Foaming Properties of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*: Effect of Lipid and Peptide Structural Attributes. *J. Agric. Food Chem.* 46, 911-916.
113. Roll,J., Nazin,A., Ljung,L., 2005. Nonlinear system identification via direct weight optimization. *Automatica* 41, 475-490.
114. Ryffel,B., Weber,E., Mihatsch,M.J., 1994. Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp. Nephrol.* 2, 324-333.
115. Saint-Jalmes,A., Peugeot,M.L., Ferraz,H., Langevin,D., 2005. Differences between protein and surfactant foams: Microscopic properties, stability and coarsening. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 263, 219-225.
116. Sandrin,C., Peypoux,F., Michel,G., 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12, 370-375.
117. Sauer,U., Hatzimanikatis,V., Hohmann,H.P., Manneberg,M., Van Loon,A.P.G.M., Bailey,J.E., 1996. Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3687-3696.
118. Schena,M., Shalon,D., Davis,R.W., Brown,P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
119. Schneider,J., Taraz,K., Budzikiewicz,H., Deleu,M., Thonart,P., Jacques,P., 1999. The structure of two fengycins from *Bacillus subtilis* S499. *Z. Naturforsch. Sect. C J. Biosci.* 54, 859-866.
120. Schwarzer,D., Finking,R., Marahiel,M.A., 2003. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* 20, 275-287.
121. Sen,R., Swaminathan,T., 1997. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 358-363.
122. Sieber,S.A., Marahiel,M.A., 2003. Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J. Bacteriol.* 185, 7036-7043.

123. Sieber, S.A., Marahiel, M.A., 2005. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* 105, 715-738.
124. Simakova, I.M., Kharatian, E.F., Vostroknutova, G.N., Bulgakova, V.G., Udalova, T.P., 1985. Organization and chemical composition of the cell wall of gramicidin S-producing *Bacillus brevis*. *Mikrobiologiya* 54, 73-82.
125. Sonenshein, A.L., Losick, R., Hoch, J.A., 2001 *Bacillus subtilis* and its closest relatives : from genes to cells. Tufts Univ Boston MA : ASM Press, 2001, 629 p.
126. Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D., Lazazzera, B.A., 2003. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* 185, 1951-1957.
127. Straight, P.D., Fischbach, M.A., Walsh, C.T., Rudner, D.Z., Kolter, R., 2007. A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 305-310.
128. Swinburne, T.R., Barr, J.G., Brown, A.E., 1975. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* and their effect on fungal colonist of apple leaf scars. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 65, 211-217.
129. Syed Mustapha, S.M.F.D., Phillips, T.N., 2000. Dynamic nonlinear regression method for the determination of the discrete relaxation spectrum. *J Phys D* 33, 1219-1229.
130. Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C., Julien, B., 2000. Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* 287, 640-642.
131. Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., Michel, G., 1992. Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem* 16, 144-151.
132. Thomaidis, H.B., Davison, E.J., Burston, L., Johnson, H., Brown, D.R., Hunt, A.C., Errington, J., Czaplowski, L., 2007. Essential bacterial functions encoded by gene pairs. *J. Bacteriol.* 189, 591-602.
133. Toscano, J., Storm, D.R., 1982. Bacitracin. *Pharmacol. Ther.* 16, 199-210.
134. Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P., 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol* 96, 1151-1160.
135. Trischman, J.A., Jensen, P.R., Fenical, W., 1994. Halobacillin: A cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Lett.* 35, 5571-5574.
136. Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., Jung, G., 1986. Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.* 39, 888-901.

137. Vilarino,A., Frey,B., Shuepp,H., 1997. MES [2-(N-morpholine)-ethane sulphonic acid] buffer promotes the growth of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an alkaline sand. *Biol. Fertil. Soil* 25, 79-81.
138. Volpon,L., Besson,F., Lancelin,J.M., 1999. NMR structure of active and inactive forms of the sterol-dependent antifungal antibiotic bacillomycin L. *Eur. J. Biochem.* 264, 200-210.
139. Volpon,L., Tsan,P., Majer,Z., Vass,E., Hollosi,M., Noguera,V., Lancelin,J.M., Besson,F., 2007. NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of L-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 67, 1374-1381.
140. Walton,R.B., Woodruff,H.B., 1949. A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. *J. Clin. Invest* 28, 924-926.
141. Wei,Y.H., Chu,I.M., 1998. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 724-728.
142. Winkelmann,G., Allgaier,H., Lupp,R., Jung,G., 1983. Iturin AL--a new long chain iturin a possessing an unusual high content of C16-beta-amino acids. *J. Antibiot. (Tokyo)* 36, 1451-1457.

## ANNEXES

Annexe 1 : Les résultats de comparaison des productions de mycosubtiline entre *B. subtilis* ATCC 6633 et BBG100 réalisées en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteur présentés au § 5.2. ont été intégrés à un ensemble plus large de résultats obtenus au laboratoire ProBioGEM et ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « Applied and Environmental Microbiology » en août 2005.

Annexe 2 : Les résultats présentés dans le § 5.3. concernant la mise au point du procédé O-EFBC et obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire LAGIS ont fait l'objet d'un article publié dans le «Journal of Biotechnology » en août 2007.

Annexe 3 : Les résultats présentés dans le § 3.7.4. concernant l'effet du transfert d'oxygène sur la production de mycosubtiline par ATCC 6633 et obtenus conjointement par le laboratoire ProBioGEM et le laboratoire de Génie Biochimique du RWTH à Aix-la-Chapelle, en Allemagne, ont fait l'objet d'un article soumis en septembre 2007 dans le «Journal of Biotechnology ».

Annexe 4 : L'effet de la température sur la production de mycosubtiline chez *B. subtilis* ATCC 6633 présenté au § 4.4. a été intégré à un ensemble de résultats obtenus au laboratoire ProBioGEM et a fait l'objet d'un article soumis dans le journal « Research in Microbiology » en novembre 2007.

Annexe 5 : Le processus de traitement des données avec le logiciel Midas de l'expérience présentée au § 4.3.1.1. est détaillé dans cette annexe.

## Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities

Valérie Leclère,<sup>1</sup> Max Béchét,<sup>1</sup> Akram Adam,<sup>2</sup> Jean-Sébastien Guez,<sup>1</sup> Bernard Wathélet,<sup>3</sup>  
 Marc Ongena,<sup>2</sup> Philippe Thonart,<sup>2</sup> Frédérique Gancel,<sup>1</sup> Marlène Chollet-Imbert,<sup>1</sup>  
 and Philippe Jacques<sup>1\*</sup>

Laboratory of Microbial Bioprocesses, Polytech Lille, University of Science and Technology of Lille, F-59655 Villeneuve  
 d'Ascq Cedex, France<sup>1</sup>; Centre Wallon de Biologie Industrielle, University of Liège, B40, B-4060 Liège,  
 Belgium<sup>2</sup>; and Unité de Chimie Biologique Industrielle, Agricultural University  
 of Gembloux, B-5030 Gembloux, Belgium<sup>3</sup>

Received 27 October 2004/Accepted 28 February 2005

A *Bacillus subtilis* derivative was obtained from strain ATCC 6633 by replacement of the native promoter of the mycosubtilin operon by a constitutive promoter originating from the replication gene *repU* of the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110. The recombinant strain, designated BBG100, produced up to 15-fold more mycosubtilin than the wild type produced. The overproducing phenotype was related to enhancement of the antagonistic activities against several yeasts and pathogenic fungi. Hemolytic activities were also clearly increased in the modified strain. Mass spectrometry analyses of enriched mycosubtilin extracts showed similar patterns of lipopeptides for BBG100 and the wild type. Interestingly, these analyses also revealed a new form of mycosubtilin which was more easily detected in the BBG100 sample. When tested for its biocontrol potential, wild-type strain ATCC 6633 was almost ineffective for reducing a *Zythium* infection of tomato seedlings. However, treatment of seeds with the BBG100 overproducing strain resulted in a marked increase in the germination rate of seeds. This protective effect afforded by mycosubtilin overproduction was also visualized by the significantly greater fresh weight of emerging seedlings treated with BBG100 compared to controls or seedlings inoculated with the wild-type strain.

Members of the *Bacillus subtilis* family produce a wide variety of antibacterial and antifungal antibiotics. Some of these compounds, like subtilin (41), subtilosin A (2), TasA (34), and subilancin (27), are of ribosomal origin, but others, such as bacitracin, chlorotetrin, mycobacillin (41), rhizocitricin (19), bacillaene (28), difficidin (40), and lipopeptides belonging to the surfactin, iturin, and fengycin families (41), are formed by nonribosomal peptide synthetases and/or polyketide synthases. The latter compounds are amphiphilic cyclic peptides composed of 7  $\alpha$ -amino acids (surfactins and iturins) or 10  $\alpha$ -amino acids (fengycins) linked to one unique  $\beta$ -amino fatty acid (iturins) or  $\beta$ -hydroxy fatty acid (surfactins and fengycins). The length of the fatty acid chain varies from C<sub>12</sub> to C<sub>16</sub> for surfactins, from C<sub>14</sub> to C<sub>17</sub> for iturins, and from C<sub>14</sub> to C<sub>18</sub> in the case of fengycins. Different homologous compounds for each lipopeptide family are thus usually coproduced (1, 16). Iturins and fengycins display strong antifungal activity and inhibit the growth of a wide range of plant pathogens (11, 17, 20, 22, 35). Surfactins are not fungitoxic by themselves but have some synergistic effects on the antifungal activity of iturin A (23).

*B. subtilis* ATCC 6633 produces subtilin (21), subtilosin (33), rhizocitricin (19), and two lipopeptides, surfactin and mycosubtilin, a member of the iturin family (21). Production of surfactin requires the *sf* operon encoding the three subunits of surfactin synthetase that catalyze the thiotemplate mechanism

of nonribosomal peptide synthesis to incorporate the seven amino acids into the surfactin lipopeptide. The mycosubtilin gene cluster consists of four open reading frames, designated *fosF*, *mycA*, *mycB*, and *mycC*, controlled by the same promoter, *P<sub>myc</sub>* (Fig. 1) (9). The subunits encoded by the three *myc* genes contain the seven modules necessary to synthesize the peptide moiety of mycosubtilin. The N-terminal multifunctional part of *mycA* shows strong homology with fatty acid and polyketide synthases.

The production of surfactin is activated by a regulatory system coupled to the accumulation of cell-derived extracellular signals at the end of exponential growth (7), while iturin synthesis is induced during the stationary phase (16).

Of the biological control alternatives to chemical pesticides used for reducing plant diseases, the application of nonpathogenic soil bacteria living in association with plant roots is promising. Treatment with these beneficial organisms was in many cases associated with reduced plant diseases in greenhouse and field experiments. These bacteria can antagonize fungal pathogens by competing for niche and nutrients, by producing low-molecular-weight fungitoxic compounds and extracellular lytic enzymes, and, more indirectly, by stimulating the defensive capacities of the host plant (10, 26, 30, 35). On the basis of the wide diversity of powerful antifungal metabolites that can be synthesized by *B. subtilis* strains, it was suggested that antibiotic production by these strains plays a major role in plant disease suppression (4, 32, 35, 38). These bacteria were reported to be effective for controlling many plant or fruit diseases caused by soilborne, aerial, or postharvest pathogens (4, 22, 35, 37, 39). Some of these strains are currently used in

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Microbial Bioprocesses (LABEM), PolytechLille, University of Science and Technology of Lille, Avenue du Professeur Langewin, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France. Phone: 33 3 28 76 74 40. Fax: 33 3 28 76 74 01. E-mail: philippe.jacques@polytech-lille.fr.

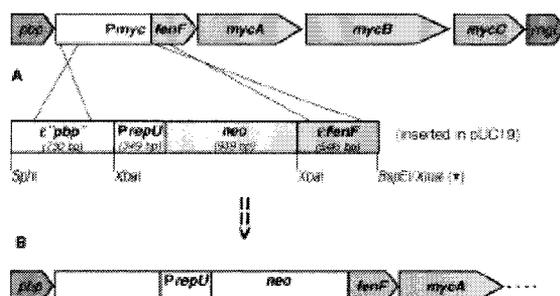


FIG. 1. Replacement in *B. subtilis* ATCC 6633 of the original  $P_{myc}$  promoter by the  $P_{repU}$ -neo cassette using homologous recombination between genomic DNA of the strain and hybrid plasmid pBG106. (A) Recognition of homologous regions located (i) after the termination region of the *gby* gene (coding for a penicillin-binding protein) located upstream of the mycosubtilin operon (for convenience, the cassette generated by PCR in this region was designated  $\psi'gby'$ ) and (ii) immediately downstream of the  $P_{myc}$  promoter (cassette  $\psi'fevF'$ ). Four genes, *fevF*, *mycA*, *mycB* and *mycC*, constitute the mycosubtilin operon and code for a malonate coenzyme A transacylase and three peptide synthetases, respectively. *repU*, gene coding for an unknown function, *PrepU*, promoter of the replication gene of pUB110, *neo*, gene conferring resistance to neomycin/kanamycin from pUB110 (15). An asterisk indicates the site newly created after ligation between the  $\psi'gby'$  and  $\psi'fevF'$ -compatible cohesive ends. (B) Construct obtained for the genomic DNA of the strain following homologous recombination (generated by the inability of pUC19 to replicate in *Sacillus* spp., together with the selective pressure for resistance to neomycin). The mycosubtilin operon came under control of the  $P_{repU}$  constitutive promoter.

commercially available biocontrol products (3, 5). However, most studies have focused primarily on the degree of disease reduction, and mechanisms of suppression in soil have not been as extensively investigated.

In this study, the native promoter of the mycosubtilin operon from *B. subtilis* ATCC 6633 was replaced by the  $P_{repU}$  promoter from staphylococcal plasmid pUB110, which was shown previ-

ously to be strong and constitutive in *B. subtilis* (36). Growth and lipopeptide production by the derivative were compared to growth and lipopeptide production by the wild type, and the antimicrobial and hemolytic activities of the derivative and the wild type were also compared. The effect of early overproduction of mycosubtilin in the biocontrol of damping-off caused by *Pythium aphanidermatum* in tomato seedlings was also evaluated.

TABLE 1. Strains and plasmids

Strain or plasmid	Description	Source or reference
<b>Bacterial strains</b>		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	$\Phi80$ dncZAM15 <i>recA1 endA1 gpt196 thi-1 hsdR17</i> ( $r_{\text{E}}^{-}$ $m_{\text{E}}^{-}$ ) <i>supE44 rcdA1</i> <i>deoB</i> $\Delta$ ( <i>lacZ</i> M1- <i>angF</i> )Clon $\phi$ <i>phoA</i>	Promega, Madison, WI
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Produces mycosubtilin, surfactin, subtilin, subtilosin, and ribococcins	9
<i>B. subtilis</i> BBG100	ATCC: 6633 derivative overproducing mycosubtilin, Nm $^r$	This study
<i>Erwinia chrysanthemi</i> 3937		Lab stock
<i>Micrococcus luteus</i>		14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TNSK2		12
<b>Fungi</b>		
<i>Bostrychia clavata</i>	Wild type	Lab stock
<i>Fusarium oxysporum</i>	Wild type	Lab stock
<i>Pythium aphanidermatum</i>	Wild type	26
<b>Yeasts</b>		
<i>Pichia pastoris</i>	Wild type	Lab stock
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wild type	Lab stock
<b>Plasmids</b>		
pUC19	Cloning vector, Ap $^r$	New England Biolabs, Beverly, MA
pBG101	0.5-kb <i>fevF</i> PCR fragment inserted into pUC19, Ap $^r$	This study
pBG102	0.7-kb <i>gby</i> PCR fragment inserted into pUC19, Ap $^r$	This study
pBG103	0.5-kb <i>S</i> all- <i>E</i> coRI <i>fevF</i> fragment from pBG101 inserted into pBG102, Ap $^r$	This study
pBEST501	pGEM4 carrying the $P_{repU}$ promoter and <i>neo</i> gene from pUB110, Nm $^r$	15
pBG106	$P_{repU}$ - <i>neo</i> fragment inserted into pBG103, Ap $^r$ Nm $^r$	This study

\* Ap $^r$ , resistance to ampicillin; Nm $^r$ , resistance to neomycin.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** The microorganisms and plasmids used in this study are listed in Table 1. *B. subtilis* strains were grown at 37°C in either Lysy medium (20) or medium 863 (1). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was cultured at 37°C in Lysy-Bertani (LB) medium supplemented, when required, with the following antibiotics: ampicillin (50  $\mu$ g ml $^{-1}$ ; Sigma, St. Louis, MO), neomycin (20  $\mu$ g ml $^{-1}$ ; Servo, Heidelberg, Germany), and streptomycin (25  $\mu$ g ml $^{-1}$ ; Sigma). The yeast strains were grown at 28°C in medium 863 (1), and the fungal strains were cultured at 37°C on potato dextrose agar (Biolar Diagnostics, Beauvais, France).

**Molecular biology procedures.** Total genomic DNA was extracted from *B. subtilis* ATCC 6633 and purified using genomic lysis 2003 together with the corresponding buffers purchased from QIAGEN (Hilden, Germany). Plasmid DNAs were prepared from *E. coli* using either Miniprep Spin or Miniprep kit (QIAGEN). Screening for hybrid plasmids in various *E. coli* transformants was done by the "boiling" procedure of Holmes and Quigley (13). For restriction endonuclease digestion, ligation, and transformation of *E. coli* by CaCl $_2$  thermal shock we used standard procedures (31). *B. subtilis* ATCC 6633 was transformed by electroporation using the method of Deniz and Sokol (8).

For construction of the pUC19-derived plasmid dedicated to promoter exchange by homologous recombination in *B. subtilis*, the *pbp* and *foeF* fragments were generated by PCR using *Taq* polymerase "Amoy" from GibcoLife (Montreal, Canada). The primers were designed by using the previously published sequence of the *mpc* subtilin operon from strain ATCC 6633 (published nucleotide accession no. AF184956) (9). The following primers were used: (i) for *pbp*, forward primer 5'-TTAGAAAGAGCATCCAAAATG-3' (the underlined anti-folI split site was generated by substitution of the two bases in boldface type) and reverse primer 5'-GCTTCCAAATCTTTTUGAAGG-3'; and (ii) for *foeF*, forward primer 5'-GACATGTATCCGCTCTGGAAGATTG-3' (the underlined anti-folI split site was generated by substitution of the two bases in boldface type) and reverse primer 5'-ATUGGCCATTCGAGCATCTCC-3'. The PCR conditions consisted of an initial denaturation step at 95°C for 2 min, followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 45°C, and 30 s at 70°C. The final extension step was at 70°C for 2 min.

The new PCR-generated cassettes were purified from 2% agarose gels using a QIAquick kit (QIAGEN), treated with phosphatase K (50  $\mu$ g ml $^{-1}$ ) for 1 h at 37°C, and subjected to dephosphorylation using a phenol-chloroform procedure. The *foeF* fragment was XbaI and BspEI double digested and in order to reduce the XbaI and XbaI sites of pUC19 to obtain pBG101. After SphI and MphI 1031 double digestion, the *pbp* fragment was inserted into SphI and PstI sites of pUC19, generating pBG102. Then, after EcoRI and SalI double digestion, the *foeF* fragment was inserted at the corresponding sites of pBG102. The resulting construct was designated pBG103. After XbaI digestion, the *P<sub>mpc</sub>* fragment was excised from pBG103 (15) and inserted into the XbaI site of pBG103. This construct, designated pBG106 (Fig. 1), was then used to transform *B. subtilis* ATCC 6633, which was plated on LB agar containing neomycin to select recombinants and incubated at 37°C.

**Lipopeptide purification and identification.** Cultures were centrifuged at 15,000  $\times$  g for 1 h at 4°C. For lipopeptide extraction, 1-mL samples of supernatants were purified on C $_{18}$  Mini-Clean cartridges (Alltech, Deerfield, IL) used according to the recommendations of the supplier. Lipopeptides were eluted with 5 mL of pure methanol (high-performance liquid chromatography grade; Acros Organics, Geel, Belgium). The extract was dried, and the residue was dissolved in methanol (200  $\mu$ l) before analysis by high-performance liquid chromatography using a C $_{18}$  column (5  $\mu$ m; 250 by 4.6 mm; VYDAC 218 TP; VYDAC, Hesperia, CA). Each family of lipopeptides was separately analyzed with the acetonitrile-water:trifluoroacetic acid solvent system (60:40:0.5 [vol/vol/vol] and 80:20:0.5 [vol/vol/vol] for lantins and surfactins, respectively). Samples (20  $\mu$ l) were injected, and compounds were eluted at a flow rate of 1 ml min $^{-1}$ . Purified lantins and surfactins were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The retention time and second derivatives of UV-visible spectra (Waters PDA 996 photodiode array detector, Millennium Software) of each peak were used to identify the eluted molecules.

Lipopeptide extracts were further analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MS). A saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-dimethyl acid was prepared in a 2:1 (vol/vol) solution of CH $_3$ CN and H $_2$ O containing 0.1% trifluoroacetic acid. The cell culture supernatant was diluted 10-fold with an  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-dimethyl acid-saturated solution. Then 0.5  $\mu$ l of this solution was deposited on the target. Measurement was performed using a UV laser desorption/ionization time of flight mass spectrometer (Bruker Ultraflex III; Bruker Daltonics) equipped with a pulsed nitrogen laser ( $\lambda$

= 337 nm). The analyzer was used at an acceleration voltage of 20 kV. Samples were measured in the reflection mode.

**Evaluation of antimicrobial and hemolytic activities.** Supernatants from *B. subtilis* cultures obtained from various media were filter sterilized with 0.2- $\mu$ m-pore-size membranes and treated or not treated for 1 h at 37°C with protease type XIV; final concentration, 10  $\mu$ g ml $^{-1}$ ; Sigma) to neutralize subtilin and subtilisin activities.

**Antimicrobial activities of supernatant samples from both wild-type and modified strains were tested by plate bioassays.** The bacterial and yeast strains to be tested were grown in LB medium and 863 medium, respectively. Overnight bacterial cultures (2 ml) were diluted (10 $^{-5}$ ) and inoculated by flooding 2 ml onto LB medium plates. The excess liquid was removed, and the plates were allowed to dry under a laminar flow hood for 30 min. In tests performed with yeast strains, 4 ml of semi-solid 863 medium (0.8% agar) containing 100  $\mu$ l of a diluted cell suspension (10 $^{-4}$ ) were spread onto 863 medium plates. In both cases, 200- $\mu$ l portions of supernatant samples were deposited in 10-mm-diameter wells created in the solidified media using sterile glass tubes. The plates were incubated at either 30°C or 37°C depending on the strain tested. A similar method was used to test supernatant samples for their antifungal activities against filamentous fungi. Mycelial plugs (5 mm) were deposited in the center of the plates at equal distances from the wells. The plates were incubated at 28°C, and inhibition zones were measured after 1 to 3 days. To evaluate the hemolytic activities of the various supernatants, 200- $\mu$ l samples were dispensed into wells made in blood agar plates (with 5% defibrinated sheep blood; Eurobio, Les Ulis, France). Hemolytic activity was visualized by development of a clear halo around the wells after incubation at 37°C. In all cases, 100 replicate plates were used for each strain on each medium, and the experiment was repeated once.

**Determination of MIC.** Serial half-dilutions of filter-sterilized culture supernatants, containing known concentrations of mycosubtilin, were prepared up to 1:1024 using 863 medium. After inoculation with 100  $\mu$ l of a diluted *Saccharomyces cerevisiae* culture (about 10 $^7$  cells ml $^{-1}$ ), the test tubes were incubated at 30°C. The MIC was determined by taking into account the higher dilution at which no growth of the test organism was visible.

**Biocontrol assays with tomato.** For preparation of a bacterial inoculum, *Bacillus* strains were grown at 30°C for 24 h in Lysy medium. Cells were harvested by centrifugation at 85,000  $\times$  g for 20 min, and the cell pellet was washed twice with sterile saline water (0.85% NaCl). Vegetative cell suspensions were then diluted in order to obtain the desired bacterial concentration for seed treatment. The origin of the fungal pathogen *P. aphaniobasidium*, maintenance of this organism, and preparation of suspensions used in the bioassays have been described previously (24).

**In the damping-off assays, tomato seeds (*Solanum lycopersicon* L. cv. Merveille des Marchés) were germinated in a peat substrate (Bell Substrate GmbH & Co. KG, Georgsdorf, Germany), referred to below as "soil." Prior to sowing, seeds were washed three times (5 min each) with sterile distilled water and soaked for 10 min in the appropriate bacterial suspension at a concentration of approximately 4  $\times$  10 $^8$  CFU ml $^{-1}$  or in NaCl (0.85% in the case of control plants). In every experiment, 200 seeds were used for each treatment. The seeds were sown in large plastic trays containing soil previously infected with *P. aphaniobasidium* by mixing with a suspension of mycelial fragments. The final concentration of the pathogen in the substrate for plant growth was 10 $^7$  propagules g (dry weight) of soil $^{-1}$ . The trays were incubated in a growth cabinet set to maintain the temperature at 28°C at 95% relative humidity with a photoperiod of 16 h. Seedling emergence was recorded after 12 days, and the number of healthy plantlets was compared to the number of seeds.**

## RESULTS

**Construction of the BBG106 mutant by allelic exchange.** Several transformation experiments with *B. subtilis* ATCC 6633 and pBG106 led to isolation of 15 Nm $^2$  colonies. Genomic DNA of these clones and the wild-type strain were purified. Direct observation of the restriction endonuclease (HindIII and PstI) profiles did not reveal any major difference (data not shown). Replacement of the natural promoter by the constitutive promoter *P<sub>mpc</sub>* associated with the *mpc* gene was demonstrated by PCR amplification of genomic DNA with the *epbf* forward and *sfenF* reverse primers. For one of the different colonies tested, a ~2.8-kb fragment was obtained instead of the ~1.5-kb fragment obtained with the wild type. The corre-

TABLE 2. Biomass and lipopeptide production by the wild-type ATCC 6633 strain and the BBG100 derivative after 72 h of growth<sup>a</sup>

Prepn	Biomass (g liter <sup>-1</sup> )	Lipopeptide production (mg liter <sup>-1</sup> )	
		Mycosubtilin	Surfactin
Wild type in flask	3.23 (0.13)	17 (0.5)	15 (4.1)
BBG100 in flask	3.19 (0.24)	203 (12.6)	10 (3.4)
Wild type in bioreactor	3.25 (0.35)	4.35 (5.1)	1.15 (1.2)
BBG100 in bioreactor	4.45 (1.4)	66 (9.7)	3.35 (4.03)

<sup>a</sup> The values are means from two experiments, and the values in parentheses are standard deviations.

sponding modified strain, designated BBG100, was compared to the wild type for the lipopeptide production level and biological activities.

**Mycosubtilin overproduction by BBG100.** Mycosubtilin production was monitored upon growth of both strains in agitated Erlenmeyer flasks and 3-liter bioreactors for 3 days (Table 2). Although the absolute levels of mycosubtilin were different in the shake flasks and the bioreactors, 12- to 15-fold increases were observed after 72 h in the BBG100 culture supernatant under the two different growth conditions. Greater production of mycosubtilin was observed in the flask with BBG100 (63.6 mg/g of cells). As expected, surfactin synthesis was not affected by replacement of the promoter since the levels of production by BBG100 and the wild type were similar under both growth conditions. The lower concentrations found in the bioreactors than in the shake flasks were probably due to the low aeration rate used in the bioreactors in order to limit liquid extraction by foaming. This resulted in lower oxygen transfer compared to that in the well-agitated flasks and thus in a reduced rate of production of lipopeptides since the synthesis of these molecules is positively influenced by oxygen (16).

The time courses of the evolution of biomass concentration and the pHs during the 72 h of growth in the fermentors were also very similar for the two strains. Typically, acidification of the medium was observed during the early exponential growth phase, and this acidification was due to the production of organic acids from glucose. This was followed by a neutralization step during the second growth phase related to the consumption of these acids and by a slight alkalization due to the use of glutamic acid as a carbon source by the cells (data not shown). It is thus likely that BBG100 had a physiological behavior similar to that of the wild type.

Analysis of lipopeptide production during the first 8 h of growth in the bioreactor revealed early synthesis of mycosubtilin by BBG100 (Fig. 2). Significant amounts of mycosubtilin were produced after 4 h of incubation when the cells entered the exponential growth phase. Despite a similar biomass level, mycosubtilin production by the wild type was not observed during the first 8 h, as expected since the synthesis of such compounds is known to occur only at the beginning of the stationary phase.

Matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight mass spectrometry analyses of lipopeptide extracts allowed identification of several homologues of surfactins and mycosubtilins produced by both strains (Fig. 3). Signals attributed to protonated forms of mycosubtilin and surfactin and their Na<sup>+</sup>

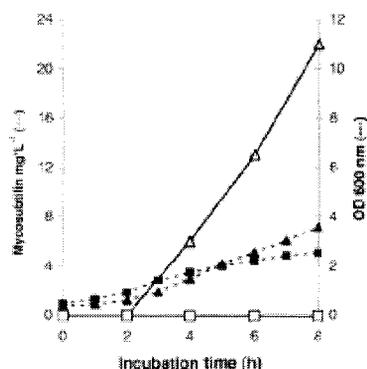


FIG. 2. Early stage of growth (solid symbols) and mycosubtilin production (open symbols) of *B. subtilis* ATCC 6633 (□) and its BBG100 derivative (△) in a bioreactor. OD 600 nm, optical density at 600 nm.

and K<sup>+</sup> adducts are summarized in Table 3. However, MS peaks showing higher intensity were detected in the extract from BBG100; a signal at *m/z* 1095.54 corresponded to the M+K<sup>+</sup> ion of the C<sub>15</sub> homologue of mycosubtilin, and, more interestingly, there was a signal at *m/z* 1137.6 which could not be attributed to known ions of surfactin or mycosubtilin.

**Biological activities.** BBG100 and the wild type were compared for their antagonistic properties against a wide range of microorganisms. Supernatants from both strains did not inhibit the growth of *Erwinia chrysanthemi*, *E. coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* even after 10-fold concentration. When tested on *Micrococcus luteus*, however, the two supernatants generated similar growth inhibition zones that completely disappeared upon treatment with protease type XIV, which neutralizes bacteriocin-like activities. By contrast, BBG100 culture supernatant induced growth inhibition zones significantly larger than those observed for the wild-type supernatant when it was tested against three phytopathogenic fungi, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, and *P. aphanidermatum*, and two yeasts, *Pichia pastoris* and *S. cerevisiae* (Table 4). Protease treatment of the supernatants slightly reduced the antifungal activity against *P. aphanidermatum*.

Serial dilutions of culture supernatants from both strains were tested independently for their inhibitory effects on the growth of *S. cerevisiae*. An eightfold-higher dilution of the BBG100 supernatant than of the wild-type supernatant was necessary to obtain the MIC of mycosubtilin. In both cases, this MIC was determined to be 8 μg ml<sup>-1</sup>. The data confirmed that the antagonistic activity against yeast of both supernatants was essentially due to mycosubtilin.

When tested for lytic activity on blood corpuscles, the supernatant from BBG100 yielded greater hemolytic areas than the supernatant of the wild type (Fig. 4).

**Protection against *Pythium* damping-off of tomato seedlings.** Biocontrol assays were conducted with the tomato *Pythium*

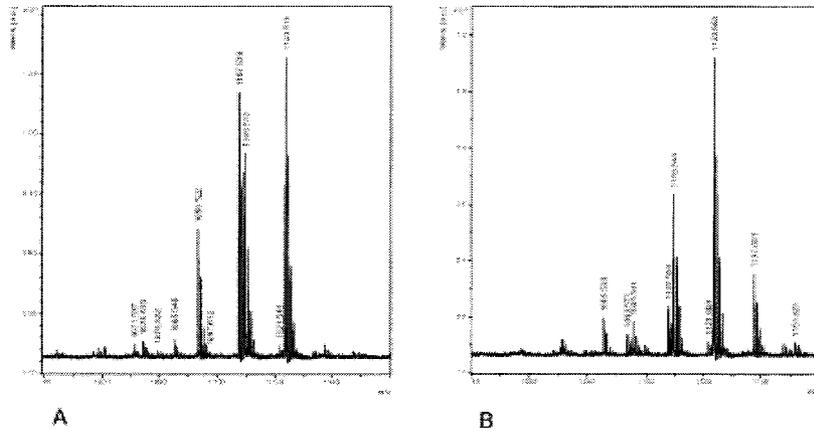


FIG. 3. Matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight spectra of lipopeptides produced by *B. subtilis* ATCC 6633 (A) and BBG100 (B).

pathosystem to compare the ability of wild-type strain ATCC 6633 with that of BBG100 for reducing seedling infection. As shown in Table 5, pretreatment of tomato seeds with vegetative cells of the wild-type strain failed to have any protective effect but appeared to be conducive to disease development. However, inoculation with the lipopeptide-overproducing derivative prior to planting led to enhanced seedling emergence that was consistently observed in four independent experiments, while strong differences were observed in disease incidence. Whether they were previously inoculated with the wild-type, with the BBG100 strain, or with no strain (healthy control), the germination rates of seeds in the absence of pathogen did not vary significantly and were in most cases between 90% and 95% (Table 5). The protective effect of BBG100 was also illustrated by an increase in the size and vigor of emerging plantlets compared to the size and vigor of diseased controls or plants inoculated with the wild type (Fig. 5). In one representative experiment, the mean value for the fresh weight of individual plants (aerial part, harvested after 18 days of incuba-

tion) was significantly greater following seed treatment with the BBG100 strain (0.79 g/plant) than it was for nonbacterized plants (0.31 g/plant) or for plants inoculated with wild-type strain ATCC 6633 (0.23 g/plant).

#### DISCUSSION

In this work, we replaced the native promoter of the mycosubtilin operon of *B. subtilis* ATCC 6633 by a constitutive promoter which governs the replication gene *repU* from *S. aureus* plasmid pUB110. This led to isolation of the BBG100 derivative, which had a 15-fold increase in the mycosubtilin production rate. The  $P_{mper}$  promoter was previously reported

TABLE 3. Calculated mass values of  $M+H^+$ ,  $M+Na^+$ , and  $M+K^+$  ions corresponding to identified homologues of surfactins and mycosubtilins in culture extracts from *B. subtilis* ATCC 6633 and the BBG100 overproducing derivative

Lipopeptide	Mass value		
	$M+H^+$	$M+Na^+$	$M+K^+$
Surfactin $C_{21}$	1008.66	1030.64	1046.61
Surfactin $C_{22}$	1022.67	1044.66	1060.63
Surfactin $C_{23}$	1036.69	1058.67	1074.65
Mycosubtilin $C_{25}$	1057.57	1079.55	1095.52
Mycosubtilin $C_{26}$	1071.58	1093.56	1109.54
Mycosubtilin $C_{27}$	1085.6	1107.58	1123.55

TABLE 4. Growth inhibition activities of supernatants obtained from growth of the ATCC 6633 wild-type strain and the BBG100 derivative

Strain	Antagonistic activity*			
	Wild type		Strain BBG100	
	Supernatant	Protease treated	Supernatant	Protease treated
<i>E. chrysanthemi</i>	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	—	—	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	—	—
<i>M. luteus</i>	+++	—	+++	—
<i>B. cereus</i>	+/-	+/-	+++	+++
<i>F. oxysporum</i>	+/-	+/-	++	++
<i>P. aphanipterygii</i>	+/-	—	++	+
<i>P. pascoensis</i>	—	—	++	++
<i>S. cerevisiae</i>	+/-	+/-	+++	+++

\* The intensity of the antagonistic activity was rated on the basis of the size of growth inhibition zones from the wells in which supernatant samples were deposited to the edge of the spreading fungal inoculum or cell colony. —, 0 mm; +/-, 1 to 4 mm; +, 5 to 7 mm; ++, 8 to 9 mm; +++, 10 mm or more.

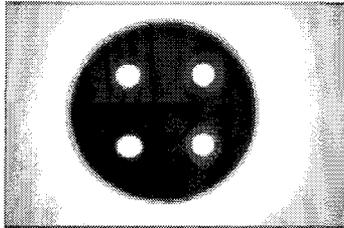


FIG. 4. Hemolytic activities of supernatants obtained after growth of the wild-type strain in Landy medium (a) or 863 medium (c) and of strain BBG100 in Landy medium (b) or 863 medium (d).

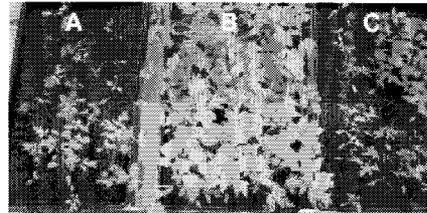


FIG. 5. Phulleis obtained from seeds treated either with wild-type *B. subtilis* strain ATCC 6633 (A), with the mycosubtilin-overproducing derivative BBG100 (B), or with water (C) (disease control) in *P. aphaniidermatum*-infested soil 13 days after sowing.

to enhance the biosynthesis of iturin A, another antifungal lipopeptide structurally very similar to mycosubtilin, by about threefold in *B. subtilis* RB14 (36).

When tested against different bacteria, yeasts, and fungi, the supernatant of the wild-type strain showed very good antagonistic activity only against *M. luteus*. This activity, which was also detected with the supernatant of the modified strain, completely disappeared upon pretreatment with protease. Thus, the antibiotic activity could be attributed to some protease-sensitive compounds, like subtilin and subtilosin, known to be produced by this strain (21, 33). The very weak antifungal activity displayed by the wild-type strain suggested that rhizocitins and mycosubtilin are produced in very small amounts. The slight reduction in antagonistic activity against *P. aphaniidermatum* observed after proteolytic treatment could have resulted from amino acids or oligopeptides liberated by the treatment and known to neutralize the biological activity of rhizocitricin (19). By contrast,  $P_{\text{myc}}$ -governed mycosubtilin overproduction in *B. subtilis* BBG100 led to clearly enhanced fungitoxic activities, showing that this lipopeptide plays a crucial role in the antagonism developed by the strain.

When applied to seeds or mixed with soil, some *B. subtilis* strains were reported to provide crop protection mostly due to direct control of soilborne pathogens through efficient production of various fungitoxic metabolites (3, 29, 32). By use of the tomato-*P. aphaniidermatum* pathosystem, this study demonstrated that overproduction of mycosubtilin by *B. subtilis*

ATCC 6633 may confer some biocontrol potential to a strain that does not naturally protect plants. Based on the mean values calculated from pooled data, the germination rate of seeds treated with the mycosubtilin overproducer was 31% greater than that of control seeds and 48% greater than that of seeds treated with the wild type. As mycosubtilin displays strong antifungal activity *in vitro* against *P. aphaniidermatum*, it is obvious that the 15-fold-higher rate of *in vitro* production of this compound is involved in the protective effect developed *in vivo* by the modified strain. Early and higher production of the lipopeptides probably enhances the biological effect of the strain by immediately reducing plant pathogen growth. The role played by these molecules is reinforced by the fact that other possible biocontrol mechanisms are seemingly not involved. For example, some *B. subtilis* strains were reported to reduce disease incidence indirectly by triggering systemic resistance in the plant (25). We performed some experiments with tomatoes preinoculated at the root level with either wild-type strain ATCC 6633 or the mycosubtilin-overproducing derivative before challenge with the pathogen *B. cinerea* on leaves. This procedure is used to reveal disease suppression due to induction of resistance in the host plant by bacteria. However, none of the strains had a protective effect under these conditions, showing that they do not have any plant resistance-inducing activity (data not shown). In the same line, growth promotion activity *sensu stricto* could also probably not be used to explain the beneficial effect of the mycosubtilin overproducer. The size and robustness of plants inoculated with the modified strain were greater than the size and robustness of disease controls and were very similar to the size and robustness of untreated controls when they were grown in a soil not infested with the pathogen (data not shown). In contrast to its overproducing derivative, wild-type strain ATCC 6633 did not have any protective effect on tomato seedlings. Surprisingly, strain ATCC 6633 even appeared to be conducive to the disease. However, when grown in the absence of pathogen, tomato plantlets inoculated with the wild type were similar to the control plants, suggesting that the strain did not have any phytotoxic effects *per se*.

Mass spectrometry analyses of supernatants from *B. subtilis* ATCC 6633 and BBG100 revealed the presence of two main molecular ions corresponding to the homologous mycosubtilins with  $C_{16}$  or  $C_{17}$  fatty acid chains. These homologues are

TABLE 5. Effect of strain ATCC 6633 and of the overproducing derivative BBG100 on the reduction of damping-off of tomato plants caused by *P. aphaniidermatum*<sup>a</sup>

Pathogen	Treatment	Seedling emergence (%)			
		Expt 1	Expt 2	Expt 3	Expt 4
-	None	NE <sup>b</sup>	96	95	ND
-	ATCC 6633	ND	90	92	ND
-	BBG100	ND	93	88	ND
+	None	38	43	59	8
+	ATCC 6633	31	25	42	6
+	BBG100	53	59	69	24

<sup>a</sup> Two hundred seeds were used for each treatment in every experiment, and the number of healthy plants was counted 12 days after planting.

<sup>b</sup> NE, not done.

considered to be more biologically active than the iturins, which have shorter hydrocarbon side chains ( $C_{14}$  and  $C_{15}$ ) (11). It has been shown that fungitoxicity increases with the number of carbon atoms in the fatty acid chain; i.e.,  $C_{17}$  homologues are 20-fold more active than the  $C_{14}$  forms. This was also shown by the similarity of the *in vitro* antagonistic activity of BBG100 and the *in vitro* antagonistic activity of other *Bacillus* strains that produce larger amounts of iturinic compounds with shorter fatty acid chains (16, 35).

The overproduction of mycosubtilin by the BBG100 derivative was also accompanied by qualitative changes in the pattern of lipopeptides. Interestingly, a signal at *m/z* 1137.7 was clearly enhanced. The corresponding compound is probably structurally similar to iturins since its appearance followed the purification of mycosubtilin. In addition, it should correspond to a  $K^+$  adduct since MS/MS analysis did not reveal any fragmentation (data not shown). Bacillomycin F with a  $C_{17}$  fatty acid chain is the sole iturin form that could correspond to this molecular weight. However, a single insertion of the new promoter was confirmed in the mycosubtilin operon. Thus, overexpression of bacillomycin synthetases is obviously not involved. This signal could thus be attributed to a modified mycosubtilin with either a  $C_{16}$  fatty acid chain or a peptide moiety containing a Thr instead of a Ser. In both cases, this molecule represents a new form of mycosubtilin. Indeed, such a long fatty acid chain was never encountered in iturin-like lipopeptides, and amino acid residue replacement has never been demonstrated with iturin derivatives. However, the last phenomenon may occur, as shown in the case of the nonribosomal surfactin synthetase which possesses adenylation domains able to activate different amino acid residues with similar side chains (18). Similarly, the mycobactin synthetase contains an adenylation domain that may recognize both L-serine and L-threonine (6). Such low specificity could thus also be observed in mycosubtilin synthetase. Further structural investigations are being performed to confirm this hypothesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work received financial support from the Université des Sciences et Technologies de Lille, the Région Nord-Pas de Calais, the Fonds Européen pour le Développement de la Recherche, and the National Funds for Scientific Research (F.N.R.S., Belgium, program F.R.F.C. 2.4.570.00).

## REFERENCES

- Alpn, E., P. Jacques, B. Wuthrich, M. Pagnon, B. Fuchs, H. Budzikiewicz, and P. Thoenart. 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91:435-441.
- Jabonval, L., T. Takai, Y. Shimomura, and K. Kurahashi. 1985. Subtilistin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168 isolate, structural analysis, and biosynthesis. *J. Biochem. (Tokyo)* 98:585-593.
- Rackman, P. A., M. Wilson, and J. F. Murphy. 1997. Bacteria for biological control of plant diseases. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla.
- Bais, P. B., R. Fall, and J. M. Vivanco. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* is mediated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134:307-319.
- Brannen, P. M., and D. S. Kanney. 1997. Kodak<sup>®</sup>—a successful biological control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:169-171.
- Challis, G. L., J. Ravel, and C. A. Townsend. 2000. Predictive, structure-based model of amino-acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* 7:211-224.
- Cooley, W. M., D. Vollbrecht, O. H. Lee, and P. Zuber. 1996. Altered *afp* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the specific oligopeptide permease and the ComC<sub>2</sub> system of extracellular compounds. *J. Bacteriol.* 168:1438-1445.
- Dennis, J. J., and P. A. Seib. 1995. Electroransformation of *Pseudomonas*, p. 125-133. In J. A. Nikoif (ed.), *Methods in molecular biology. Electroporation protocols for microorganisms*, vol. 47. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Dulman, F. H., L. W. Hansen, M. Reinbold, C. Venema, H. Selix, W. Saenger, E. Bernhardt, M. Schmidt, C. Ulrich, T. Seela, F. Leenders, and J. Vaur. 1999. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13294-13299.
- Hundelmann, J., and E. V. Stahl. 1996. Biocontrol of soft-home plant pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869.
- Höhl, C. 1996. Ph.D. thesis, University of Liege, Liege, Belgium.
- Höhl, M., S. Bursens, N. Kossian, and P. Cornille. 1993. Zinc affects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the microsphere *Pseudomonas aeruginosa* 78522. *Bioinorg. Chem.* 493-501.
- Holmes, D. S., and M. Outgley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.
- Hugouariou-Cotto-Patru, N., B. Douraguez, and J. Robert-Baudouy. 1992. Environmental conditions affect transcription of the peptidase genes of *Erwinia chrysanthemi*. *J. Bacteriol.* 174:7807-7818.
- Iaya, M., K. Kondo, and T. Tanaka. 1989. A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic Acids Res.* 17:4416.
- Jacques, P., C. Höhl, J. Destain, H. Ranaivosoa, M. Pagnon, E. De Pauw, and P. Thoenart. 1999. Optimization of bioactive lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77:223-233.
- Koehnnecht, A., X. H. Chen, A. Heise, H. Liesegang, G. Haezler, P. Franke, J. Vater, and B. Borriss. 2006. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus cereus* ATCC 27062. *J. Bacteriol.* 188:1084-1096.
- Kowall, M., J. Vater, E. Klapp, T. Sato, P. Franke, and D. Zewow. 1998. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Colloid Interface Sci.* 204:1-8.
- Klapp, M., W. Löffler, C. Rapp, A. Kern, and G. Jung. 1990. Ethrocinin A, an antifungal peptidone-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6632: biological properties. *Arch. Microbiol.* 153:276-281.
- Landy, M., C. H. Warren, S. B. Rossman, and L. C. G. Gokh. 1988. Bacillomycin, an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67:539-541.
- Leenders, E., T. H. Snel, B. Kahlir, P. Franke, and J. Vater. 1999. Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix-assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry of intact cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13:943-949.
- Leifer, C., H. Li, S. Chibura, S. Harapana, S. Workman, D. Sigso, H. A. Epron, and A. Harbour. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL17 and *Bacillus pumilus* CL45. *J. Appl. Bacteriol.* 78:97-105.
- Magar-Dana, R., I. Thimon, F. Feppon, and M. Prék. 1982. Surfactin-iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74:1047-1051.
- Ongeva, M., F. Daryf, P. Jacques, P. Thoenart, N. Benhamou, T. C. Paulkz, and R. E. Belanger. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatment with fluorescent *Pseudomonas*. *Plant Pathol.* 49: 528-539.
- Ongeva, M., F. Daryf, E. Jourdan, T. Baudry, V. Jedin, J. Dommes, and P. Thoenart. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:692-698.
- Ongeva, M., F. Daryf, F. Rossignol, M. L. Fuzconier, J. Dommes, and P. Thoenart. 2004. Stimulation of the lipopeptide pathway is associated with systemic resistance induced in bean by a non-pathogenic *Pseudomonas* strain. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1009-1018.
- Paulk, S. H., A. Chakrabarti, and J. N. Hanson. 1998. Identification and characterization of the structural and transport genes for, and the chemical and biological properties of, subtilin 168, a novel antimicrobial produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 273:23134-23142.
- Paulk, P. S., S. Huang, S. Fisher, B. Pirnik, C. Akhori, L. Dean, E. Meyers, P. Fernandes, and E. Mayer. 1995. Bacillacene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 48:997-1003.
- Pham, C. G., M. Shoda, and H. Kubota. 1993. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioproc.* 6:61-7.
- Raupach, G. S., and J. W. Kloepper. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158-1164.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant diseases. *J. Bioc. Bioproc.* 8: 515-521.

33. Sela, E., S. Discherus, A. Stroh, and K. D. Entian. 2004. Subtilisin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-sab cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2249-2253.
34. Steyer, A. G., and A. Driks. 1999. Secretion, localization and antibacterial activity of TsaA, a *Bacillus subtilis* spore-associated protein. *J. Bacteriol.* 181:1664-1672.
35. Tsune, Y., M. Oigawa, P. Jacques, A. Guizo, and P. Thonart. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96: 1151-1160.
36. Tsuge, K., T. Akhama, and M. Shoda. 2001. Cloning, sequencing and characterization of the *intinA* operon. *J. Bacteriol.* 183:6262-6273.
37. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:497-511.
38. Yoshida, S., S. Hiradate, T. Tsukamoto, K. Takakada, and A. Shirai. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus aryabhattayensis* EC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91:181-187.
39. Yu, G. Y., J. B. Sridhar, C. L. Harman, and E. L. Bernaganti. 2002. Production of lincos A by *Bacillus aryabhattayensis* suppressing *Botrytis cinerea*. *Soil Biol. Biochem.* 34:955-963.
40. Zimmerman, S. B., C. D. Schwarz, R. L. Monaghan, B. A. Poth, B. Weissinger, E. C. Gillilan, S. Mochales, S. Hernandez, S. A. Currie, E. Tejeda, et al. 1987. DMKicin and oxylinolgin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 40:1677-1681.
41. Zuber, P., M. M. Nakano, and M. A. Murakel. 1993. Peptide antibiotics, p. 893-916. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



## Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides

J.S. Guez<sup>a,\*</sup>, S. Chenikher<sup>b</sup>, J.Ph. Cassar<sup>b</sup>, P. Jacques<sup>a</sup>

<sup>a</sup> ProBioGEM, Laboratoire des Procédés Biologiques Génie Enzymatique et Microbien, UPRES-EA 1026, Polytech-Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bd Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>b</sup> LAGIS, Laboratoire d'Automatique Génie Informatique et Signal, Polytech-Lille, UMR 8146 CNRS, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bd Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Received 3 January 2007; received in revised form 11 May 2007; accepted 21 May 2007

### Abstract

This work is related to the set-up of overflowing exponential fed-batch cultures (O-EFBC) derived from carbon limited EFBC dedicated to the production of mycosubtilin, an antifungal lipopeptides belonging to the iturin family. O-EFBC permits the continuous removal of the product from the bioreactor achieving a complete extraction of mycosubtilin. This paper also provides a dynamical Monod-based growth model of this process that is accurate enough to simulate the evolution of the specific growth rate and to correlate it to the mycosubtilin specific productivity. Two particular and dependant phenomena related to the foam overflow are taken into account by the model: the outgoing flow rate of a broth volume and the loss of biomass. Interestingly, the biomass concentration in the foam was found to be lower than the biomass concentration in the bioreactor relating this process to a recycling one. Parameters of this model are the growth yield on substrate and the maximal specific growth rate estimated from experiments led at feed rates of 0.062, 0.071 and 0.086 h<sup>-1</sup>. The model was extrapolated to five additional experiments carried out at feed rates of 0.008, 0.022, 0.040, 0.042 and 0.052 h<sup>-1</sup> enabling the correlation of the mean specific growth rates with productivity results. Finally, a feed rate of 0.086 h<sup>-1</sup> corresponding to a mean specific growth rate of 0.070 h<sup>-1</sup> allowed a specific productivity of 1.27 mg of mycosubtilin g<sup>-1</sup> of dried biomass h<sup>-1</sup>.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*; Biosurfactant lipopeptides; Mycosubtilin; Foaming; Exponentially fed-batch culture; Parameter identification

### 1. Introduction

*Bacillus subtilis* produces bioactive lipopeptides such as iturin, surfactin (Bonmatin et al., 2003) and fengycin (Schneider et al., 1999) with high potential in biotechnological and pharmaceutical applications. A lot of interest has focussed on their surface-active properties since they are recently considered as an alternative to chemical surfactants. In addition, molecules like mycosubtilin, a member of iturin family, show a high potential as an antifungal (Maget-Dana and Feypoux, 1994). A main difficulty during the production process of lipopeptide biosurfactants in aerated and stirred bioreactors lies in the high foaming properties of these surface-active compounds. They cause the massive overflow, out of the bioreactor, of the culture broth containing

cells. The use of chemical antifoams is limited because of their influence on the oxygen transfer rate and their effect on the biomass physiology (Lee and Kim, 2004). The foam overflow was used by different authors to ensure the recovery of surfactin from *B. subtilis* culture broth in a collector (Cooper et al., 1981; Davis et al., 2001).

In this work, a process was developed to extract lipopeptide biosurfactants like mycosubtilin and surfactin using the foaming properties of these products. Instead of trying to avoid the foaming phenomenon, the broth foaming capacity was increased by using a loaded surface impeller and the foam was collected in continuous in a collector. A feeding strategy was applied in reference to the carbon-limited exponential fed-batch culture (EFBC) protocol with a given feed rate as reference parameter. In the range of the low feed flow rates that were used, the flow rates of the overflowing foam and of the feed were equal and the broth volume was then kept constant in the bioreactor. This process is called, in the

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 28 76 74 09; fax: +33 3 28 76 74 01.  
E-mail address: [jean-sebastien.guez@polytech-lille.fr](mailto:jean-sebastien.guez@polytech-lille.fr) (J.S. Guez).

Nomenclature	
$f_{in}$	feeding flow rate ( $L \cdot h^{-1}$ )
$f_{out}$	overflowing flow rate ( $L \cdot h^{-1}$ )
$K_S$	saturation constant ( $g \cdot L^{-1}$ )
$m_{SS}$	maintenance coefficient ( $g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ )
$S$	substrate concentration in the bioreactor ( $g \cdot L^{-1}$ )
$S_{in}$	substrate concentration in the feed ( $g \cdot L^{-1}$ )
$S_0$	substrate concentrations in the bioreactor at the feed beginning ( $g \cdot L^{-1}$ )
$V$	volume of culture medium in the bioreactor (L)
$V_{col}$	volume of culture medium in the collector (L)
$V_{lim}$	maximal volume of culture medium imposed by the impeller position (L)
$V_{out}$	volume of the overflow foaming (L)
$V_0$	volume of culture medium at the feed beginning (L)
$X$	biomass concentration in the bioreactor ( $g \cdot L^{-1}$ )
$X_{col}$	biomass concentration in the collector ( $g \cdot L^{-1}$ )
$X_{out}$	biomass concentration in the foam ( $g \cdot L^{-1}$ )
$X_0$	biomass concentration in the bioreactor at the feed beginning ( $g \cdot L^{-1}$ )
$Y_{XS}$	actual growth yield on substrate ( $g \cdot g^{-1}$ )
$Y_{XS}^{feed}$	growth yield on substrate ( $g \cdot g^{-1}$ )
<i>Greek symbols</i>	
$\alpha$	coefficient of the linear model of biomass concentration in the foam
$\beta$	coefficient of the linear model of biomass concentration in the foam ( $g \cdot L^{-1}$ )
$\mu$	specific growth rate ( $h^{-1}$ )
$\mu_{max}$	maximum specific growth rate ( $h^{-1}$ )
$\tau$	time constant of the exponential feed rate (h)

rest of the paper, overflowing exponentially fed-batch culture (O-EFBC).

Since the process operates with a constant volume, it could be related to continuous cultures. For these cultures, the biomass concentration in effluent flow is equal to biomass concentration in the bioreactor. Analysis of biomass concentration in the foam collector clearly shows that it is not the case for the O-EFBC. Only a part of the biomass is extracted from the foam following a linear relationship. Whatever the relationship between biomass concentration in foam and in bioreactor, since the former is lower than the latter, the O-EFBC benefits from the advantage of the increase of the biomass concentration in the bioreactor. This process could be thus considered as a recycling one (McIntyre et al., 1999; Shuler and Kargi, 2002). Due to the biomass recycling, the specific growth rate is no more constant even with exponential feed flow rate. A dynamical model is needed to simulate the evolution of the specific growth rate during the experiments.

Section 2 of the article provides the description of experimental conditions and of data collection. Section 3 addresses the modelling framework and theoretical aspects for identification of the parameters of the model. While the optimisation strategy

is given in Section 4; Section 5 provides a discussion of experimental results and of the design of the model. It exhibits the relationship between the mean specific growth rates estimated by the model and the mycosubtilin productivity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strain and growth conditions in flask and bioreactor

The strain BBG100 used in this study is a mycosubtilin overproducer derivative obtained by Leclère et al. (2005) from *B. subtilis* ATCC 6633 by replacement of the native promoter of the mycosubtilin synthetase operon by a promoter originating from the replication gene *repU* of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110. The inoculum was prepared in two stages. Growth medium was first inoculated by adding a loopful of cells conserved at  $-80^\circ\text{C}$  in a rich medium containing 40% glycerol. Cells were grown at 140 rpm and  $30^\circ\text{C}$  in Erlenmeyer flasks containing medium E (Clark et al., 1981). The culture was then inoculated in Erlenmeyer flasks containing the Landy medium modified as follows: glucose,  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $2.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; yeast extract,  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; glutamic acid,  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4$ ,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{KCl}$ ,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4$ ,  $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ .

A 5-L Bioflow 3000 bioreactor (New Brunswick, NJ, USA) was inoculated with mid-logarithmic grown cells, previously washed with one volume of a sterile solution of  $\text{NaCl}$   $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  after a 5 min and  $3000 \times g$  centrifugation. The pH was controlled at the value of 6.5 with adding  $\text{KOH}$  or  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solutions. Temperature was controlled at  $30^\circ\text{C}$ . The aeration rate was fixed at 0.25 VVM and the dissolved oxygen concentration was controlled above 10% of the saturation concentration thanks to the adaptive stirrer speed ranging from 200 to 400 rpm. The feed medium was a two-fold concentrated Landy modified medium.

The used impellers were two Rushton turbines arranged in a specific way. The lower one was immersed in the broth, as it is done classically in a culture process, to ensure the stirring and the oxygen transfer. The upper impeller was unusually fixed just above the initial height of the liquid broth. During the fed-batch phase, this impeller was progressively immersed in the liquid broth favouring the mixing at the gas-liquid interface. The obvious effect of this loaded surface impeller was to increase drastically the foaming capacity at the gas liquid interface. The off-gas cooling devices were oversized in order to get a more compact foam in the bioreactor outgoing tubes. The foam was collected in cooled collecting devices. The software used for controlling the process and acquiring data was AFS Biocommand (New Brunswick, NJ, USA).

### 2.2. The overflowing exponential fed-batch culture (O-EFBC)

The O-EFBC process was divided in three main stages, Fig. 1. In phase I, cells were grown 24 h in a preliminary batch culture. The stirrer speed increased progressively to maintain the dissolved oxygen above 10% of the saturation concentration until

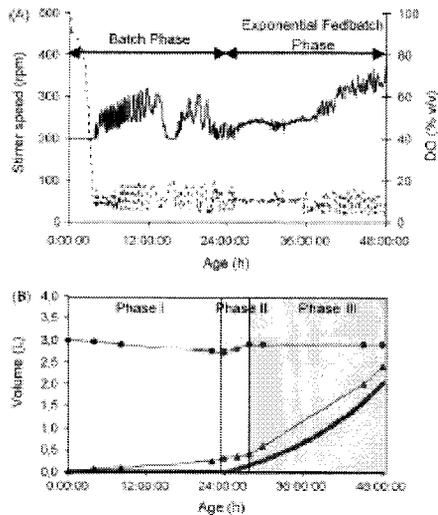


Fig. 1. (A) Evolution of the stirrer speed and of the dissolved oxygen during an O-EBFC of *Bacillus subtilis* BBG100 operated above  $DO = 10\%$  of the saturation constant, at  $30^\circ\text{C}$ , pH 6.5 and a feed rate  $1/\tau = 0.06\text{ h}^{-1}$ . (B) Evolution of the volume  $V$  in the bioreactor (●), of the volume  $V_{col}$  in the foam collector (▲) and of the cumulated feed volume (---) during the O-EBFC. Phases I and II are operated at non-constant volume  $V$  and phase III at constant volume  $V$ . Phase I represents the batch phase, phase II the exponential fed-batch phase, phase III the overflowing exponential fed-batch phase.

the main carbon source was depleted. It is to notice that the re-consumption of organic acid by-products like acetate was observed. In phase I, the volume  $V$  of broth in the bioreactor decreased because of the foam overflow appearing in the early stage according to the constitutive production of mycosubtilin. In phase II, the cells were grown in an exponential fed-batch culture where the volume  $V$  increased according to the exponentially feed flow rate.  $f_{in}(t)$  was calculated according to the following formula derived from carbon-limited EFBC:

$$f_{in}(t) = \frac{V_0 X_0}{Y_{X/S}^{feed} (S_{in} - S_0)} \frac{e^{t/\tau}}{\tau} = R(t) \frac{e^{t/\tau}}{\tau} \quad (1)$$

where  $R(t)$  is the initial value of the feed flow rate calculated from the initial biomass quantity  $V_0 X_0$ ,  $Y_{X/S}^{feed}$  biomass yield on glucose used to calculate the feed rate,  $0.30\text{ g g}^{-1}$ , close to the value of  $0.31\text{ g g}^{-1}$  (Lee et al., 1997),  $S_{in}$  and  $S_0$  the glucose concentrations in the feed medium,  $40\text{ g L}^{-1}$ , and in the bioreactor at the feed beginning, close to  $0\text{ g L}^{-1}$  and  $1/\tau$  is the expected growth rate under the assumption of a pseudo steady-state EFBC. Finally, a constant volume  $V$  operation of the exponential fed-batch culture was achieved in phase III as the foam overflow rate became equal to the feed flow rate. During phases II and III, the stirrer speed increased progressively reflecting the oxygen demand of the growing cells. The lengths

of these phases depend on the values of  $R(t)$  and the feed rate  $1/\tau$ . The constant volume  $V$  operation could not be ensured for high feed rates because  $f_{in}$  became higher than  $f_{out}$ . Eight O-EBFC experiments operated at different feed rates  $1/\tau$  ranging from  $0.008$  to  $0.086\text{ h}^{-1}$  were done.

### 2.3. Analyses

#### 2.3.1. Lipopeptides

Culture and overflowed foam samples were centrifuged at  $10,000 \times g$  for 10 min. A volume of 1 mL of the supernatants was purified through C18 Max-Clean cartridges (Alltech, Deerfield, USA). The charged column was washed with 8 mL of water and 8 mL of a 50/50 water and methanol solution. The lipopeptides were then eluted with 8 mL of 100% methanol (HPLC grade, Acros Organics, Geel, Belgium). The extract was brought to dryness before dissolution in 200  $\mu\text{L}$  methanol. The sample is then injected and analyzed by high-performance liquid chromatography using a C18 column ( $5\text{ }\mu\text{m}$ ,  $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$ , 218 TP, VYDAC). The mycosubtilins were separated with an acetonitrile/water/trifluoroacetic acid solvent, 40:60:0.5 (v/v/v), and surfactins with an acetonitrile/water/TFA 80:20:0.5 (v/v/v). The flow rate was  $1\text{ mL min}^{-1}$ , detection wavelength is 214 nm. Purified mycosubtilins and surfactins used as standards were from Sigma. The retention time and second derivative of the absorption spectrum between 200 and 400 nm (Diode Array PDA 996, Waters) were used to identify the eluted molecules (Millennium Software, Waters).

#### 2.3.2. Biomass

The bacterial dry weight was determined after drying 48 h at  $110^\circ\text{C}$  a washed pellet of a 10 mL sample. The optical density at 600 nm was read with a spectrophotometer (UV Mini 1 240, Shimadzu, Japan). An optical density of 1.0 corresponded to a biomass concentration of  $0.33\text{ g D.W L}^{-1}$ .

### 3. Modelling and theoretical aspects

The model of the process must handle both EFBC and O-EBFC behaviours that were respectively observed in the phase II and III of the experiments. A dynamic model based on biomass balance in the bioreactor and in the collector is derived from the general state space dynamical model described by Bastin and Dochain (1990).

#### 3.1. General dynamic model equations

The investigated model is nonlinear in terms of both its parameters and variables. In the rest of the presentation, all the variables are functions of time. For simplicity, this mention is avoided when it is not necessary. The mass balance of biomass and substrate in the bioreactor are given by:

$$\frac{dVX}{dt} = \mu VX - X_{out} f_{out}, \quad \mu = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \quad (2)$$

$$\frac{dVS}{dt} = - \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_S \right) VX + S_{in} f_{in} - S f_{out} \quad (3)$$

$$\frac{dV}{dt} = f_{in} - f_{out} \quad (4)$$

where the specific growth rate is modelled in Eq. (2) as a Monod's function. The mass balance in the foam collector is given by:

$$\frac{dV_{eq}X_{out}}{dt} = X_{out}f_{out} \quad (5)$$

In this part, the model involves four parameters (see Nomenclature for the definitions):  $\mu_{max}$ ,  $K_S$ ,  $m_S$  and  $Y_{X/S}$  related to physiological characteristics of the microorganism. This model allows tackling phases II and III of the culture process.

### 3.2. Relationship between biomass concentration in the bioreactor and in the foam

In continuous bioprocesses without recycling, biomass concentration in the effluent flow is equal to the concentration in bioreactor  $X$ . However, for foam-overflowing processes, as only a part of biomass is extracted, the biomass concentration in the dragged foam  $X_{out}$  can be expressed by the linear relation:

$$X_{out} = \alpha X + \beta \quad (6)$$

where  $\alpha$  and  $\beta$  coefficients are two additional parameters of the model. This relation allows handling two main assumptions.  $X_{out}$  is proportional to  $X$  ( $\beta=0$ ) that corresponds to a partial recycling process, or  $X_{out}$  is independent from  $X$  ( $\alpha=0$ ).

### 3.3. Description of the foam overflowing flow rate

In phase II, since the foam overflowing flow rate is very small, the output flow is considered to be zeroed, that leads to the condition:  $f_{out} = 0 \text{ L.h}^{-1}$ . The broth volume in bioreactor,  $V$ , is a function of time and depends on the feeding flow rate  $f_{in}$ .

In phase III, the process operates at a constant volume. Therefore, the foam overflowing flow rate must be equal to the feed flow rate that leads to the condition:

$$f_{out} = f_{in} \quad (7)$$

In order to verify these two conditions and to ensure the transition between both phases, the foam overflowing flow rate can be globally calculated as a function of  $V$ :  $f_{out} = f_{in}(CV_{lim} - V)$ , where  $C = 10^{-3} \text{ L}$ , is a constant related to the very small overflowing of foam that remains in phase II. This form also guarantees the volume  $V$  in the bioreactor to be constant in phase III and equal to  $V_{lim} - C$ .

## 4. Parameter estimation strategies

### 4.1. Optimisation scheme

Parameter estimation consists in finding a set of appropriate values for the model parameters using the available experimental data. Parameter identification of nonlinear dynamical models can be applied to biological culture process (Gao et al., 2005). A chosen objective function, subject to the constraints represented

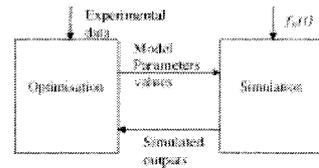


Fig. 2. Model optimisation scheme.

by the dynamical model is optimised according to the parameters values. The objective function reflects the discrepancies between the experimental data and the output of the model. It can be considered as a measurement of the quality of the fitting operation between these two datasets. A typical objective function is defined as the sum of the squared errors between the experimental dataset and the model outputs, simulated for given trial parameters values.

$$J(\theta) = \sum_{j=1}^{N_E} \sum_{i=1}^{N_S(j)} (\xi_{ij} - \hat{\xi}_{ij})^T (\xi_{ij} - \hat{\xi}_{ij}) \quad (8)$$

$$\theta^* = \arg \min_{\theta} J(\theta)$$

where  $N_E$  is the number of experiments,  $N_S(j)$  the number of samples in experiment  $j$ ,  $\xi$  and  $\hat{\xi}$  are respectively the vectors of the measured and the model output values.  $\theta$  and  $\theta^*$  are respectively the vector and the optimised vector of parameters.

The nonlinear scheme of the model imposes an iterative procedure for the estimation of its parameters and the small number of available data imposes the reduction of the number of these parameters. The quality of the fit depends on the quality of the data that is affected by uncertainties inherent in the measurement and analysing processes. A good choice of initial guesses for the parameter values and boundaries is very important to reach the global minimum. The optimisation procedure whose scheme is given in Fig. 2 makes iterative adjustments of the parameter values to drive the objective function to its minimum. Once, this objective is reached, the obtained parameter values are kept to be used in the model.

Unconstrained methods for parameter estimation do not introduce information about parameter boundaries (Syed and Phillips, 2000). In the alternate case, constrains methods are subjected to parameter boundary values (Roll et al., 2005) thus reducing the size of the domain in which the optimal solution is searched. Here, boundary values are tested between 0.19 and  $0.45 \text{ g g}^{-1}$  for the growth yield on substrate and between 0.30 and  $0.40 \text{ h}^{-1}$  for the maximal specific growth rate. For our application, the quadratic objective function is calculated from three experimental datasets. We choose a gradient-based method, which is implemented in Matlab™ software by `fmincon` function, to solve constrained nonlinear optimisation problem. In this function, an estimate of the Hessian of the Lagrangian function is updated at each iteration. Simulink™ achieves the simulation procedure.

4.2. Biomass concentration estimation in the foam overflow

Since the amount of biomass in the foam collector is measured by the dry weight technique which requires a minimum of collected volume, the biomass concentration in the foam  $X_{out}$  is not directly available. Under the assumption, that  $X_{out}$  remains constant on a short enough time period  $[t_1, t_2]$ ,  $X_{out}$  can be estimated as the relation between variations of biomass quantity and volume variations in the foam collector. The concentration of the biomass in the foam overflow is estimated as a ratio of the variation of biomass quantity and the variations of volume during the time period between two measurements.

$$\hat{X}_{out}[t_1, t_2] = \frac{\Delta(V_{col}X_{col})[t_1, t_2]}{\Delta(V_{col})[t_1, t_2]} \quad (9)$$

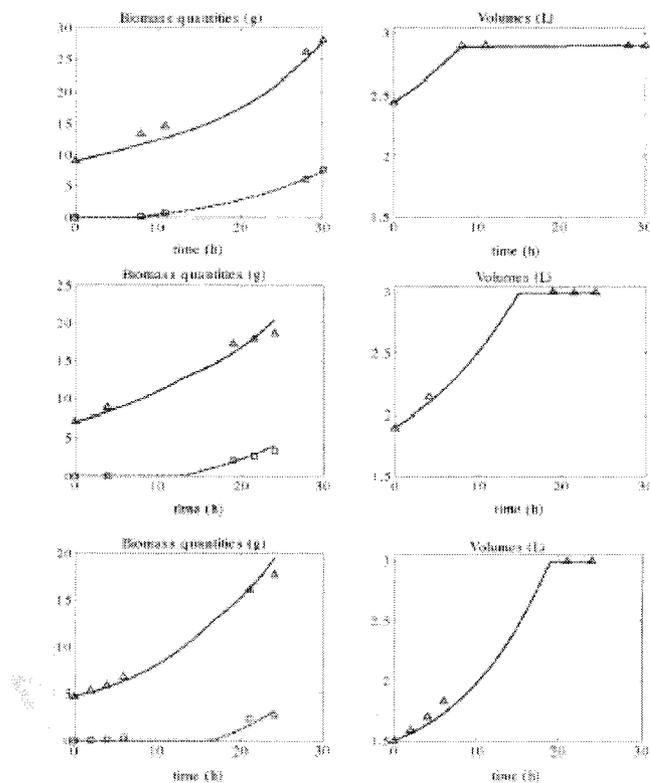


Fig. 4. Measured and simulated values of biomass quantities in the bioreactor ( $\Delta$ ) solid) and in the foam collector ( $\square$ ) dashed), for the three experiments operated at different feed rates  $1/r=0.062$  (left up),  $1/r=0.071$  (left middle) and  $1/r=0.086$  (left down) expressed in  $h^{-1}$ . The standard deviation of residual errors was 0.83 g. Measured and simulated values of volume in the bioreactor ( $\Delta$ ) solid) for the three experiments operated at different feed rates  $1/r=0.062$  (right up),  $1/r=0.071$  (right middle) and  $1/r=0.086$  (right down) expressed in  $h^{-1}$ . These values were calculated according to the parameter subset  $\mu_{max}=0.33 h^{-1}$ ,  $Y_{CS}=0.20 g g^{-1}$ ,  $\alpha=0$  and  $\beta=2.01 g L^{-1}$  estimated with  $m_0=0.065 g g^{-1} h^{-1}$  and  $K_0=0.015 g L^{-1}$ .

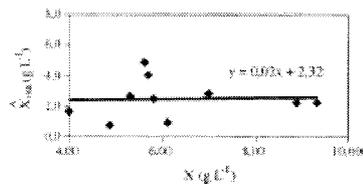


Fig. 3. Measured biomass in the bioreactor and in the collector expressed in  $g L^{-1}$ .

where  $X_{col}$  is the biomass concentration in the collector and  $V_{col}$  is the collector volume.

The value of the biomass concentration to be correlated with  $\hat{X}_{out}[t_1, t_2]$  is the mean value of the  $X$  on the time period  $[t_1, t_2]$ .

#### 4.2. Optimisation strategy

In our experiments, the small number of samples for each experiment might not allow the proper estimation of all parameters of the model which are  $\mu_{\max}$ ,  $K_S$ ,  $m_S$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ . Therefore, a subset of pertinent parameters that can be reliably estimated from the available data has to be selected.

As the process operates at carbon limited-growth at low growth rates and according to the shape of sensitivity functions, parameters  $K_S$  and  $\mu_{\max}$  are correlated (Neykova et al., 2000; Patnaik, 1999). Estimating them simultaneously is not recommended. Therefore,  $K_S$  was fixed at  $0.015 \text{ g L}^{-1}$  close to the value of  $0.019 \text{ g L}^{-1}$  (Martinez et al., 1998) and of  $0.018 \text{ g L}^{-1}$  determined previously in our laboratory. The boundary values of  $m_S$  were defined according to previous published values from  $0.065$  (Monroy and De La Torre, 1996) to  $0.12 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Sauer et al., 1996). Thus, the set of parameters to be estimated was reduced to the subset  $K_S$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ .

### 5. Results and discussion

#### 5.1. Lipopeptides extraction performances

A process for continuous production of mycosubtilin with *B. subtilis* BBG100 strain was set up based on an O-EFBC. Three experiments were performed at different feed rates  $1/r$ . The final concentration of lipopeptides in the bioreactor and in the foam collector are given in Table 1. Both, mycosubtilin and surfactin were found as expected but exclusively in the foam collected outside the bioreactor. The biosurfactant recovery percentage was thus about 100%. Similar recovery into the foam was previously described for surfactin (Davis et al., 2001) but never for any iturinic compounds.

#### 5.2. Estimation of the biomass concentration in the foam

The estimation of the biomass concentration in the foam is expressed as a function of the mean concentration in the bioreactor in Fig. 3. It exhibits a pseudo-constant  $X_{\text{out}}$  zone within a  $X$  range comprised between 4 and  $10 \text{ g L}^{-1}$ . A linear regression performed in this zone gives  $\alpha = 0.02$  and  $\beta = 2.32 \text{ g L}^{-1}$ . The low value of  $\alpha$  indicates that the biomass concentration in the foam  $X_{\text{out}}$  is quite independent from the biomass concentration in the bioreactor  $X$ .

Table 1

Concentrations of mycosubtilin and surfactin expressed in  $\text{mg L}^{-1}$  in the bioreactor and in the foam collector for O-EFBC operated at different feed rates  $1/r = 0.062$ ,  $1/r = 0.071$  and  $1/r = 0.086$  expressed in  $\text{h}^{-1}$

$1/r$	Foam collector		Bioreactor	
	Mycosubtilin	Surfactin	Mycosubtilin	Surfactin
0.062	155	10	1	ND
0.071	210	13	2	1
0.086	268	12	2	ND

ND: not detected.

#### 5.3. Estimation of the model parameters

The optimisation strategy permits the estimation of the parameter subset  $\mu_{\max}$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $\alpha$  and  $\beta$ . Results are given in Table 2 for both  $m_S$  boundary values. With a  $m_S$  of  $0.12 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , the value of  $\beta$  obtained is equal to  $1.70 \text{ g L}^{-1}$ . As  $m_S$  becomes equal to  $0.065 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , the value of  $\beta$  reaches  $2.01 \text{ g L}^{-1}$  getting more close to the value of  $2.32 \text{ g L}^{-1}$  determined experimentally in Fig. 3. The estimated value of  $\alpha$  is equal to zero and thus confirms the independency of the biomass concentration in the foam  $X_{\text{out}}$  from the biomass concentration in the biore-

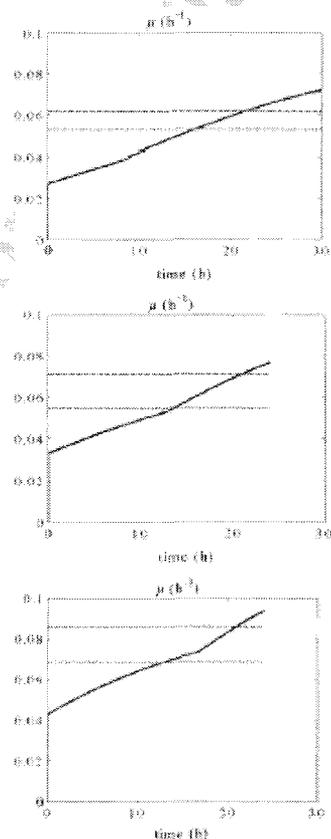


Fig. 5. Evolution of the growth rate  $\mu$  (solid curves), mean value  $\mu_{\text{mean}}$  (dotted curve) and feed rate  $1/r$  (dashed curve), for the three experiments operated at different feed rates  $1/r = 0.062$  (up),  $1/r = 0.071$  (middle) and  $1/r = 0.086$  (down) expressed in  $\text{h}^{-1}$ . These values were calculated according to the parameter subset  $\mu_{\max} = 0.33 \text{ h}^{-1}$ ,  $Y_{X/S} = 0.20 \text{ g g}^{-1}$ ,  $\alpha = 0$  and  $\beta = 2.01 \text{ g L}^{-1}$  estimated with  $m_S = 0.065 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and  $K_S = 0.015 \text{ g L}^{-1}$ .

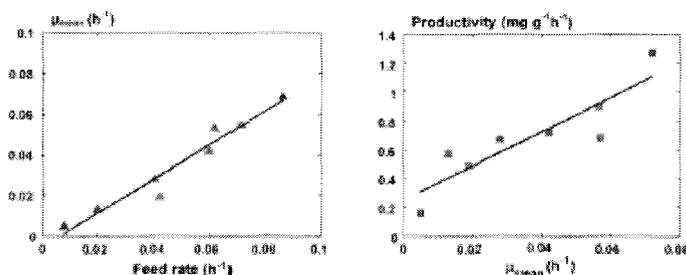


Fig. 6. Productivity expressed in  $\text{mg}$  of mycosubtilin  $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ , as functions of mean growth rate  $\mu_{\text{mean}}$  expressed in  $\text{h}^{-1}$  (right). Mean growth rate  $\mu_{\text{mean}}$  as a function of the feed rate expressed in  $\text{h}^{-1}$  (left).

Table 2  
Model parameters estimation  $\mu_{\text{max}}^*$ ,  $Y_{X/S}^*$ ,  $\alpha^*$  and  $\beta^*$  determined for  $K_S = 0.015 \text{ g L}^{-1}$

$m_S$ ( $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}^*$ ( $\text{g L}^{-1}$ )	$Y_{X/S}^*$ ( $\text{g g}^{-1}$ )	$\alpha^*$	$\beta^*$ ( $\text{g L}^{-1}$ )
0.065	0.33	0.20	0.000	2.01
0.12	0.30	0.25	0.043	1.70

actor  $X$ . The value of  $\mu_{\text{max}}$  of  $0.33 \text{ h}^{-1}$  is also very close to the value of  $0.35 \text{ h}^{-1}$  calculated during phase I of the process. Consequently, a  $m_S$  value of  $0.065 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  was chosen in the sequel of the article for further simulations. The  $Y_{X/S}$  value is equal to  $0.20 \text{ g g}^{-1}$  which is slightly lower than expected according to the bibliography. In case of *B. subtilis* growths on glucose, authors generally report values ranging from 0.31 (Lée et al., 1997) to  $0.46 \text{ g g}^{-1}$  (Sauer et al., 1996). The low value of the growth yield on glucose is synonymous with a low energy efficiency. In our case, this phenomenon could be explained by two factors. First, acetate has been detected in the culture medium and thus represents an energetic loss. Second, the presence of a substrate like glutamic acid in the culture medium leads to the non-oxidative conversion of pyruvic acid to acetoin (Keynan et al., 1954) representing a potential supplementary loss of energy. Previous experimental measurements done in our laboratory during batch culture of *B. subtilis* ATCC 6633 in shaken flasks in the presence of both glucose and glutamic acid (Guez et al., 2004) allowed the calculation of  $Y_{X/S}$  values above  $0.22 \text{ g g}^{-1}$  close to the value of  $0.20 \text{ g g}^{-1}$  estimated by the model.

Measured and estimated biomass quantities in bioreactor and in the foam collector are represented in Fig. 4 (left). They correspond to the application of the optimisation strategy with  $m_S = 0.065 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  and  $K_S = 0.015 \text{ g L}^{-1}$ . The standard deviation of the residual errors between experimental data and the model outputs is equal to 0.83. It should be noticed that the error was 23% higher in the case of results simulated with a parameters subsets estimated with a  $m_S$  of  $0.12 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$  confirming our choice of a  $m_S$  of  $0.065 \text{ g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ . The evolution of the measured volume in the bioreactor is represented in Fig. 4 (right) and fits with the estimated values.

#### 5.4. Correlation between mean specific growth rate and productivity

The growth rate simulation is done and the evolution curves as functions of time for three different feed rates are given in Fig. 5.

For fed-batch phase II where foaming is negligible, the specific growth rate increases to reach the expected limit value of  $\mu_{\text{lim}} = 1/\tau$ . The beginning of the foam overflow in phase III induces an increase of the slope of the  $\mu$  curve. In Appendix A, we demonstrate that the limit value of the specific growth rate can be reached and is greater than  $1/\tau$ . Indeed this limit value is equal to:

$$\mu_{\text{lim}} = \frac{1/\tau}{1 - (X_{\text{out}}/Y_{X/S}S_{\text{in}})} + \frac{m_S}{(S_{\text{in}}/X_{\text{out}}) - (1/Y_{X/S})}$$

Results shown in Fig. 5 confirm that the mean values of the specific growth rates  $\mu_{\text{mean}}$  are lower than  $\mu_{\text{lim}}$  for each experiment. The model was extrapolated to five additional experiments led at feed rates of 0.008, 0.022, 0.040, 0.042 and  $0.062 \text{ h}^{-1}$ . Simulations were performed and the standard deviation of residual errors were in the range [1.09 g, 1.43 g]. The same simulations as in Fig. 4 were also performed and were correlated to productivity. Fig. 6 (left side) shows that the mean value of specific growth rate was a linear function of the feed rate. This result confirmed the remark about the influence of the feed rate on the effects of the phenomena of phase II and phase III. Fig. 6 (right side) presents the productivity as a function of the mean values of specific growth rate  $\mu_{\text{mean}}$ . It shows that, in the range of feed rates that was used, the productivity can be approximated by a linear relation of the mean growth rate. Therefore, the maximum mycosubtilin productivity corresponds to the maximum growth rate. The specific productivity in mycosubtilin was maximal for feed rate of  $0.066 \text{ h}^{-1}$ . It reached the value of  $1.27 \text{ mg}$  of mycosubtilin  $\text{g}^{-1}$  of biomass  $\text{h}^{-1}$ .

#### 6. Conclusion and prospects

Production of biosurfactants by aerobic microorganisms in bioreactors is frequently limited by the foaming. O-EFBC is a bioprocess in which this problem becomes an advantage because

of the high recovery percentage of the biosurfactant in the foam. In our study, the continuous removal of the mycosubtilin led to a recovery percentage approaching 100%. Foaming overflow also leads to the loss of a biomass concentration determined to be quite independent of the biomass concentration in the bioreactor and measured at about  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ . This result was confirmed from an original model that permits the handling of the cases of both exponential fed-batch and overflowing exponential fed-batch. The parameter estimation permitted the simulation of the output values of the process  $VX$  and  $V_{\text{out}}X_{\text{out}}$  with a global standard deviation of  $0.83 \text{ g}$  for the three experiments that were used for the parameter estimation. After extrapolating the model to five additional experiments, this error remained acceptable. It showed the good ability of the model to predict the process behaviour at different feed rates. Based on this knowledge, constant-feeding strategies allowing the growth of the microorganism at sustainable and constant specific growth rates as it is done in partial recycling process could be considered for further physiological studies requiring a steady-state. From this model, a quasi-linear relationship between productivity and the mean specific growth rate obtained from simulations was established. According to this relationship, applying higher feed rates would probably lead to a supplementary gain in productivity. This prospect could be reached by getting a more efficient foaming using another type of impeller that would hold up a constant volume of broth during the O-EFBC. However, the productivity of  $1.27 \text{ mg}$  of mycosubtilin  $\text{g}^{-1}$  of biomass  $\text{h}^{-1}$  obtained with the highest tested feed rate of  $0.086 \text{ h}^{-1}$  was better than any other productivity determined in batch cultures with *B. subtilis* BBG100 observing a six-fold improvement.

#### Acknowledgements

This work received the financial support from the Université des Sciences et Technologies de Lille, the Région Nord Pas de Calais and the European Funds for the Regional Development.

#### Appendix A

##### A.1. Fed-batch phase II

For fed-batch phase, from Eq. (2) we have:

$$\mu = \frac{\mu_{\text{lim}} S}{K_S + S} \quad (\text{A.1})$$

At time instant  $t = 0$ , before the fed-batch, as  $S \approx 0$ , then  $\mu = 0$ .

For a steady state of the fed-batch culture from the model (2) to (4), we obtain  $\mu_{\text{lim}} = f_{\text{in}}/V = 1/\tau$ .

##### A.2. Foam-overflowing phase III

In the foaming phase of the process, from Eq. (3), we have

$$V \frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{XS}} VX + (S_{\text{in}} - S) f_{\text{in}} - m_S VX, \quad \text{as } \frac{dV}{dt} = 0$$

Looking for the steady value of  $\mu$  imposes to consider  $\mu = \mu_{\text{lim}}$  and  $S$  as constants.

So,  $dS/dt = 0$  and  $(\mu_{\text{lim}}/Y_{XS}) VX = (S_{\text{in}} - S) f_{\text{in}} - m_S VX$ , and then,

$$VX = \frac{Y_{XS}}{\mu_{\text{lim}} + Y_{XS} m_S} (S_{\text{in}} - S) f_{\text{in}} \quad (\text{A.2})$$

Differentiating the two members of Eq. (A.2) leads to:

$$\frac{dVX}{dt} = \frac{Y_{XS}}{\mu_{\text{lim}} + Y_{XS} m_S} (S_{\text{in}} - S) \frac{df_{\text{in}}}{dt}$$

From feed flow rate  $f_{\text{in}}$  Eq. (1), it can be deduced that  $df_{\text{in}}/dt = (1/\tau) f_{\text{in}}$ . So,

$$\frac{dVX}{dt} = \frac{Y_{XS}}{\mu_{\text{lim}} + Y_{XS} m_S} (S_{\text{in}} - S) \left(\frac{1}{\tau}\right) f_{\text{in}} \quad (\text{A.3})$$

Substituting Eq. (A.2) into (2) leads to

$$\frac{dVX}{dt} = \frac{\mu_{\text{lim}} Y_{XS}}{\mu_{\text{lim}} + Y_{XS} m_S} (S_{\text{in}} - S) f_{\text{in}} - X_{\text{out}} f_{\text{in}} \quad (\text{A.4})$$

From (A.3) and (A.4),

$$\begin{aligned} & \frac{Y_{XS}}{\mu_{\text{lim}} + Y_{XS} m_S} (S_{\text{in}} - S) \left(\frac{1}{\tau}\right) f_{\text{in}} \\ &= \frac{\mu_{\text{lim}} Y_{XS}}{\mu_{\text{lim}} + Y_{XS} m_S} (S_{\text{in}} - S) f_{\text{in}} - X_{\text{out}} f_{\text{in}} \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

As the process operates on small values of substrate  $S \ll S_{\text{in}}$ , at steady state we obtain from Eq. (A.5):

$$\frac{1}{\tau} \times Y_{XS} S_{\text{in}} = \mu_{\text{lim}} Y_{XS} S_{\text{in}} - X_{\text{out}} \mu_{\text{lim}} - X_{\text{out}} m_S Y_{XS}$$

$$\begin{aligned} \mu_{\text{lim}} &= \frac{Y_{XS} S_{\text{in}} (1/\tau) + Y_{XS} m_S X_{\text{out}}}{Y_{XS} S_{\text{in}} - X_{\text{out}}} \\ &= \frac{1/\tau}{1 - (X_{\text{out}}/(Y_{XS} S_{\text{in}}))} + \frac{m_S}{(S_{\text{in}}/X_{\text{out}}) - (1/Y_{XS})} \\ &= \frac{1}{\tau} \times \frac{1 + (X_{\text{out}} m_S / (1/\tau) S_{\text{in}})}{1 - (X_{\text{out}} / (Y_{XS} S_{\text{in}}))} > \frac{1}{\tau} \end{aligned}$$

If  $X_{\text{out}}$  is constant, the steady state value of  $\mu$  ( $\mu_{\text{lim}}$ ) is greater than the reference value imposed by the feed rate.

#### References

- Basin, G., Dochain, D., 1990. On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Elsevier, Amsterdam.
- Bonnamy, J.M., Laprevote, O., Peypoux, F., 2003. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. A trinity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinat. Chem. High Throughput Screen* 6, 541–556.
- Clark, J.B., Munnecke, D.M., Jennehan, G.E., 1981. In situ microbial enhancement of oil recovery. *Dev. Ind. Microbiol.* 22, 695–701.
- Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B., Kosaric, N., 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (3), 408–412.
- Davis, D.A., Lynch, H.C., Varley, J., 2001. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC21332 cultures. *Enzym. Microb. Technol.* 28, 346–354.
- Gao, C., Feng, E., Wang, Z., Xiu, Z., 2005. Parameter identification problem of the nonlinear dynamical system in microbial continuous cultures. *Appl. Math. Comput.* 159 (1), 476–484.

- Guez, J.S., Lecière, V., Bechet, M., Jorin, H., Jacques, P., 2004. Influence of pH on the production of mycosubtilin, an antifungal metabolite from *Bacillus subtilis* with potential applications in agro-food sector. Poster presented at the International Congress on Bioprocesses in Food Industries (ICBF), July 11–13, 2004, Clermont-Ferrand, France.
- Keynan, A., Strecker, H.J., Walsch, H., 1954. Glutamine, glutamic acid, and glycolysis in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 211 (2), 883–891.
- Lecière, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancef, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P., 2005. Characterization of a constitutive mycosubtilin overproducing *Bacillus subtilis* strain and its antagonistic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (10), 4577–4584.
- Lee, B.S., Kim, E.K., 2004. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enzym. Microb. Technol.* 35, 639–647.
- Lee, J., Goel, A., Atani, M.M., Donach, M.M., 1997. Supply-side analysis of growth of *Bacillus subtilis* on glucose-citrate medium: feasible network alternatives and yield optimality. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (2), 710–718.
- Maget-Dana, R., Beyroux, F., 1994. Durins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology* 87 (1–3), 151–174.
- Martínez, A., Ramírez, O.T., Valle, F., 1998. Effect of growth rate on the production of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* using glucose-limited exponentially fedbatch cultures. *Enzym. Microb. Technol.* 23 (6), 520–526.
- McIntyre, J.J., Bunch, A.W., Bull, A.T., 1999. Vancomycin production is enhanced in chemostat culture with biomass-recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 62 (5), 376–382.
- Mourey, R.M., De La Torre, M., 1996. Effect of the dilution rate on the biomass yield of *Bacillus thuringiensis* and determination of its rate coefficients under steady-state conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 (4), 546–550.
- Noykova, N., Müller, T., Gyllenberg, M., 2000. Sensitivity analysis and parameter estimation in a model of anaerobic wastewater treatment process with substrate inhibition. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 23, 343–349.
- Patnaik, P.R., 1999. Transient sensitivity analysis of a cybernetic model of microbial growth on two substrates. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 21 (2), 135–140.
- Roll, J., Nazari, A., Ljung, L., 2005. Nonlinear system identification via direct weight optimization. *Automatica* 41 (3), 475–490.
- Sauer, U., Hatzimanikatis, V., Hohmann, H.P., Manneberg, M., Van Loon, A.P., Bailey, J.E., 1996. Physiology and metabolic fluxes of wild-type and riboflavin-producing *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (10), 3687–3696.
- Schneider, J., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Dejen, M., Thonart, F., Jacques, P., 1999. The structure of two fengycins from *Bacillus subtilis* S499. *Z. Naturforsch. C* 54 (11), 859–865.
- Shuler, M.L., Kargi, F., 2002. Operating considerations for bioreactors for suspension and immobilized cultures. In: Guerrieri, P., Goodsie, B., Vincenzi, M. (Eds.), *Science Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Prentice Hall International Series in the Physical and Chemical Engineering, Upper Saddle River, pp. 245–284.
- Sved Mustafa, S.M.E.D., Phillips, T.N., 2000. Dynamic nonlinear regression method for the determination of the discrete relaxation spectrum. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33 (10), 1219–1229.

### **ANNEXE 3**

## **Respiration Activity MONitoring System (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633**

**J.S. GUEZ<sup>a</sup>, C.H. MÜLLER<sup>b</sup>, P.M. DANZE<sup>c</sup>, J. BÜCHS<sup>b</sup>, P. JACQUES<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>ProBioGEM, UPRES-EA 1026, Polytech-Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bd Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>b</sup>Biochemical engineering, RWTH Aachen University, Sammelbau Biologie, Worringerweg 1, 52074 Aachen, Germany

<sup>c</sup>IFR114-IMPRT (functional genomic platform), Faculté de Médecine H. Warembourg, Place de Verdun, F-59045 Lille

(\*) Author for correspondence: [jean-sebastien.guez@polytech-lille.fr](mailto:jean-sebastien.guez@polytech-lille.fr)

Tel : 0033 (0)3 28 76 74 09

Fax : 0033 (0)3 28 76 74 01

### **Abstract**

The effect of oxygen transfer rate on the synthesis of mycosubtilin, a non ribosomal lipopeptide antifungal biosurfactant, was investigated in the Respiration Activity MONitoring System (RAMOS) for two *Bacillus subtilis* strains. These cultures were performed under definite oxygen-limited conditions without the adding of any anti-foam in the culture medium. By using four different filling volumes in the shaken bioreactors, different levels (20, 14, 9 and 7 mmol O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) of oxygen-limited growth could be obtained. A 25-fold increase of the specific productivity of mycosubtilin was observed for *Bacillus subtilis* ATCC6633 in the case of the most severe oxygen limitation. But nearly no effect could be found with strain BBG100 carrying the constitutive P<sub>repU</sub> promoter instead of the natural P<sub>myc</sub> promoter. Transcript analysis of the *fenF* gene belonging to the *myc* operon indicated that the

$P_{myc}$  promoter regulation could be slightly oxygen sensitive. Additionally, different isoform patterns of the synthesised mycosubtilin were obtained for different level of oxygen-limited growths. At the present state of investigation, oxygen regulation was thus shown to act at different levels suggesting the existence of a complex regulatory system of NRPS lipopeptide synthesis in the natural *B. subtilis* ATCC 6633 strain.

Keywords: RAMOS, oxygen-limited growth, biosurfactant lipopeptide, mycosubtilin, *Bacillus subtilis*

## Introduction

*Bacillus subtilis* is known for its ability to produce several bioactive nonribosomal peptides (Grünwald and Marahiel, 2006) and among others, lipopeptides which are classified into three main families according to their chemical structure: surfactin, fengycin and iturin (Bonmatin et al., 2003, Schneider et al., 1999). The family of iturins composed of iturin A, A<sub>L</sub>, C, mycosubtilin, bacillomycin F, L, D, and LC. Most of them combine biosurfactant and antifungal activities. In particular, mycosubtilin which is a pore-forming lipopeptide (Maget-Danat and Peypoux, 1994) is considered as one of the most antifungal iturinic compounds. The first strain *Bacillus subtilis* ATCC6633 used in this work is a natural mycosubtilin and surfactin producer (Duitman et al., 1999). The second strain, BBG100, is a mycosubtilin overproducing derivative obtained by Leclère et al., 2005.

The production process of lipopeptide is known to be influenced by environmental conditions such as pH, temperature, agitation and oxygen availability (Desai et Banat, 1997). In particular, oxygen availability changes metabolic pathways and fluxes in *Bacilli* (Çalik et al., 2000) affecting the synthesis of lipopeptide (Ohno et al., 1993, Jacques et al., 1999). Most of the studies investigating this effect were carried out in shake flasks with conventional agitation, filling volumes or plugs changing methods but no data on oxygen transfer rate (OTR) are available. In stirred bioreactors, only few references report the effect of the culture parameters on the production of non ribosomal lipopeptides, namely surfactin (Sen et Swaminathan, 1997) and surfactin/iturin A (Hbid et al., 1996). In the first article, the authors showed that a low agitation and high aeration rate favoured the synthesis of surfactin by strain *B. subtilis* DSM 3256. In the second article, the authors showed that, when the stirring rate

decreases, *B. subtilis* S499 produces half as much surfactin and twice as much iturin. These latter experiments were performed in the presence of oxygen vectors that may have influenced the cell metabolism. No clear evidence of the effect of the OTR could be drawn from these studies because of the absence of gas analysis and of the influence of the oxygen transfer conditions on the foaming. The lack of studies on this topic principally arise from the difficulty to manage the high foaming capacity of the culture medium during the production process in bioreactors, especially as the adding of synthetic or natural antifoam is not recommended because of the risk of interferences with the physiological state of the strain (Lee and Kim, 2004).

For the first time, our work investigates the effect of oxygen limitation on the lipopeptide biosurfactant synthesis under definite OTR conditions thanks to the RAMOS. In our study, there was no need to add antifoam in the culture medium since the surface aeration strategy in shaken reactors lowered the broth foaming capacity. The effect of oxygen on the natural  $P_{myc}$  promoter of the *myc* operon encoding for the mycosubtilin synthetase was discussed. Indirect influence of OTR was pointed out with showing the different mycosubtilin isoform patterns obtained for the different oxygen-limited growths.

## Materials and Methods

### Strains and growth conditions

*B. subtilis* ATCC6633, a mycosubtilin and surfactin producer, and the derivative BBG100 were tested in this study. BBG100 was previously obtained in our laboratory by replacing the native promoter  $P_{myc}$  of the mycosubtilin synthetase operon by a constitutive promoter  $P_{repU}$  originating from *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110. The preculture medium (Clark, 1981) was inoculated with a loopful of cells conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cells were grown in Erlenmeyer flasks at  $30^{\circ}\text{C}$  with a shaking speed of 140 rpm. Cells were then alternatively transferred to RAMOS flasks or Erlenmeyer flasks containing the modified Landy medium pH 7.0 composed as follows : Glucose,  $20 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $(\text{NH})_2\text{SO}_4$ ,  $2.3 \text{ g.l}^{-1}$ , Glutamic acid,  $2 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $1 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4$   $0.5 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $\text{KCl}$ ,  $0.5 \text{ g.l}^{-1}$ ;  $\text{CuSO}_4$ ,  $1.6 \text{ mg.l}^{-1}$ ;  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ,  $1.2 \text{ mg.l}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $0.4 \text{ mg.l}^{-1}$ . Culture medium was buffered with MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid) 100 mM and no yeast extract was added. Before

inoculation, the preculture was centrifuged and washed in  $9 \text{ g.l}^{-1}$  NaCl solution. The starting optical density of the main culture was 0.25 corresponding to a biomass concentration of  $0.8 \text{ g(D.W).l}^{-1}$ . The optical density was measured at 600 nm using a Kontron Uvicon 922.

### **RAMOS system**

The oxygen transfer rate (OTR) was measured online using the Respiration Activity Monitoring System (RAMOS) described in Anderlei et al., 2004. By using four different filling volumes (FV) of 10 ml, 25 ml, 42 ml and 60 ml corresponding to filling volume ratios (FVR) of 0.04, 0.1, 0.17 and 0.24, four levels of oxygen transfer capacity could be obtained in 250 ml RAMOS flasks for strain ATCC6633. Three non-monitored shake flasks were cultivated simultaneously under same conditions and used for sampling. Each sample flask was only used once in order to avoid the modification of the flask filling volume. The shaker was operated at 175 rpm, 50 mm shaking diameter and the temperature set at  $30^{\circ}\text{C}$ . Similar experiments were conducted with strain BBG100 by using 10, 42 and 60 ml filling volumes.

### **Analysis**

Culture samples were centrifuged at  $10,000g$  for 10 min. A volume of 1 ml of the supernatants was purified through C18 Maxi-Clean cartridges (Alltech) following the protocol described by Guez et al., 2007 for lipopeptide HPLC analysis. Purified mycosubtilins and surfactins used as standards were supplied by Sigma. The retention time and second derivative of the absorption spectrum between 200 and 400 nm (Diode Array PDA 996, Waters) were used to identify the eluted molecules (Millenium Software, Waters). MALDI-MS analysis for mycosubtilin C-16 and C-17 homologues identification was performed using a UV laser desorption-time of flight mass spectrometer (Brucker Ultraflex tof, Brucker Daltonics) following the procedure described by Leclère et al., 2005.

Glucose concentrations were determined using a Dionex HPLC system with an organic-acid-resin column ( $300 \times 8 \text{ mm}$ , CS-Chromatography) at  $60^{\circ}\text{C}$ . Samples were prefiltered on  $0.45 \mu\text{m}$  Millex-HV (Millipore). A 1 mM sulphuric acid mobile phase was pumped at a flow rate of  $0.8 \text{ ml.min}^{-1}$ .

Enzymatic assay was used to analyse the L-glutamic acid (Enzytec Fluid, Scil Diagnostic, Germany).

### RNA isolation and reverse transcription

Culture samples were taken after two doubling times which corresponded to the early exponential growth and four doubling times which corresponded to the beginning of the oxygen-limited growth. A volume corresponding to  $1.10^9$  cells was sampled and added to the Ambion Ribopure RNALater solution (v/v), mixed thoroughly during 10 s and centrifuged 10 min at  $-9^{\circ}\text{C}$  and 11 000 g. The supernatant was discarded and the pellet stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Duitman et al., 2007 indicated that natural isolates like ATCC6633 were often difficult to transform. In the frame of this work, authors add that RNA isolation of ATCC6633 is also difficult to perform with respect to the high resistance of its cell wall. For isolation of RNA, the cell pellets were resuspended in 50  $\mu\text{l}$  of a 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  lysosyme solution. After 10 min of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , 350  $\mu\text{l}$  of RNAWiz phenolic solution were added. Mechanical cell lysis in the presence of 250  $\mu\text{l}$  of zirconium beads was led for 10 min at maximal speed (Mixer Mill 200). The lysate was then centrifuged 5 min at 12 000 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . After having discarded the beads, 0.2 volume of chloroform was added. The mixture was incubated 10 min at room temperature and centrifuged 5 min at 12 000 g and  $4^{\circ}\text{C}$ . The aqueous phase was retrieved and 0.5 volume of ethanol added. Purification of RNA was then completed following the Ribopure Ambion protocole. The quantity of total RNAs was measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer. The quality was estimated with calculating the RNA 23S/16S ratio with a capillary electrophoresis (RNA 6000 NanoAssay, Agilent 2100 bioanalyzer).

The reverse-transcription was done with mixing 3  $\mu\text{g}$  of total RNA and 0.5  $\mu\text{l}$  hexamers (Invitrogen) to a final volume of 8.2  $\mu\text{l}$  in  $\text{H}_2\text{O}$ . The mixture was heated at  $65^{\circ}\text{C}$  for 10 mn and cooled at  $4^{\circ}\text{C}$  before the adding of 3  $\mu\text{l}$  of 5X First Strand Buffer (Invitrogen), 1.5  $\mu\text{l}$  of 0.1M DTT (Invitrogen), 0.3  $\mu\text{l}$  of 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Amersham), 1  $\mu\text{l}$  of Rnase Inhibitor and 1  $\mu\text{l}$  of SuperScript II (200 U/ $\mu\text{l}$ , Invitrogen). Incubation of this mixture at  $42^{\circ}\text{C}$  during 1 h was followed by the readding of 0.5  $\mu\text{l}$  SuperScript II and a subsequent incubation at  $42^{\circ}\text{C}$  during 45 min. To estimate the level of expression of the *myc* gene coding for the mycosubtilin synthetase, a 398 bp PCR product belonging to the *fenF* locus of the *myc* operon was amplified using the following pair of oligonucleotides : 5'-CAAATGCAGATCCTGAGCA-3' and 5'-GGCATAGTCATGTGCGTTG-3'. PCR products were analysed by electrophoresis on 1.5% agarose gel and the Median-based Trimmed Mean density (MTM) values of the bands were obtained thanks to Arrayvision scanner (Qiagen). MTM values of each band corresponding to *fenF* products were normalised

with the MTM values of a 330 bp amplified product belonging to *rplL*, a housekeeping gene of *B. subtilis* coding for the ribosomal protein L12. Results were rescaled with respect to the experiment led at FVR=0.05. The following pair of oligonucleotides 5'-GCTTCCGTTAAAGAAGCAACTG-3' and 5'-AGAAGCGCCAACCTTCTCAA-3' were used for *rplL*. The PCR mixture was done with the following reagents: cDNA, 0.5  $\mu$ L; 10X buffer, 2.5  $\mu$ l; dNTP (2.5mM), 1 $\mu$ l; MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1.5  $\mu$ l; forward primer, 0.5  $\mu$ L; reverse primer, 0.5  $\mu$ L, completed to 25 $\mu$ l with H<sub>2</sub>O. 0.2  $\mu$ l of Taq Gold (5U/ $\mu$ l) are then added to the mixture. The amplification conditions were 5 min at 94°C followed by 30 cycles: 30 s at 94°C, 30 s at 56°C, 60 s at 72°C and one cycle at 72°C for 5 min before conservation of the PCR product at 4°C.

## Results

OTR-monitored cultures of ATCC6633 were first led in RAMOS flasks. Figure 1 shows the oxygen transfer rate (OTR) evolution. After a period of latency of 10 h due to the absence of yeast extract in the culture medium, the oxygen transfer rate increased until the maximal oxygen transfer rate was reached. RAMOS flasks with filling volumes of 60, 42, 25 and 10 ml allowed oxygen-limited growths at 7, 9, 14 and 20 mmol O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> respectively. A decrease in the OTR then occurred successively for the experiments at a FV of 10, 25 and 42 ml because of the complete consumption of the carbon source. In case of the most severe oxygen-limitation obtained at a FV of 60 ml, the experiment was ended before total depletion of the carbon source. HPLC analysis showed that 0.45 g.l<sup>-1</sup> of glucose and 0.056 g.l<sup>-1</sup> of glutamic acid remained in the culture medium at 48 h (table 1). *B. subtilis* ATCC6633 and BBG100 showed similar pH evolution for the different oxygen-limited growths. The pH dropped from 7.0 $\pm$ 0.04 to respectively 6.06 $\pm$ 0.03 and 5.98 $\pm$ 0.11 after 48 hours of culture (Table 1).

Oxygen availability played an important role in the lipopeptide synthesis by ATCC6633. The mycosubtilin production increased with the strength of the oxygen limitation from 2.4 to 45.4 mg.l<sup>-1</sup> (figure 2A). This result was amplified for the mycosubtilin specific productivity as the increase ranged from 0.001 to 0.025 mg.g (DW)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (table 1). In the case of the BBG100 strain carrying the constitutive *P<sub>repU</sub>* promoter instead of the native *P<sub>myc</sub>*, the mycosubtilin production remained quite constant in the range of 70 to 80 mg.l<sup>-1</sup> (figure 2B) and the specific

productivity in the range of 0.033 to 0.035 mg.g (DW)<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (table 1). Considering the experiments where the carbon sources were totally depleted before the end of the culture, no diminution of the mycosubtilin production was observed during the culture (fig 2A) whereas this phenomenon occurred in the case of surfactin (figure 2C) rendering the surfactin production kinetics difficult to analyse. Nevertheless, the surfactin production by the mycosubtilin overproducing strain BBG100 (figure 2D) was lowered in comparison to ATCC6633.

Oxygen dependent regulation of the native P<sub>myc</sub> promoter of ATCC6633 was inspected through a transcript analysis performed on the *fenF* gene that belongs to the *myc* operon coding for the mycosubtilin synthetase. Figure 3 shows comparative RT-PCR results obtained for different oxygen-limited growths led in 500 ml non-monitored Erlenmeyer flasks filled with 20, 50, 100 and 200 ml corresponding to FVR of 0.05, 0.1, 0.2, and 0.4. At n=2, MTM ratios of *fenF* were quite similar for the different FVR indicating the absence of transcriptional regulation of the P<sub>myc</sub> promoter in the early exponential growth, *i.e* before oxygen-limited growth. At n=4 and a FVR ranging from 0.05 to 0.2, the expression of *fenF* remained quite constant whereas the mycosubtilin production measured at 24 h was shown to increase from 1.95 to 21.9 mg.l<sup>-1</sup> (figure 4). Alternatively, *fenF* was slightly repressed at n=4 and FVR=0.4. In this experiment, the mycosubtilin production at 24 h interestingly dropped to 4.5 mg.l<sup>-1</sup>. This result showed that the positive effect of oxygen-limited growth on the mycosubtilin synthesis can be inverted in the case of too severe oxygen limitations.

Different mycosubtilin isoform patterns were obtained for the different oxygen-limited growths in Erlenmeyer flasks at a FVR of 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 (figure 4). Patterns corresponding to FVR of 0.1 and 0.2 showed a quite constant distribution of the mycosubtilin isoforms: 36% of *i*-C-16, 3% of C-16 (undetermined isomery), 45% of *ai*-C17 and 16% of C-17 (undetermined isomery). Patterns corresponding to FVR of 0.05 or 0.4 showed an increase of the *ai*-C-17 mycosubtilin and a slight decrease of the *i*-C-16.

## Discussion

Among the environmental factors affecting the production of lipopeptide biosurfactants, authors pointed out the importance of the pH for microorganism in general (Desai et Banat, 1997) and *B. subtilis* ATCC6633 in particular (Guez et al., 2004). Effects of the pH were therefore largely reduced in this study with buffering the medium with MOPS 100 mM.

Combined results obtained in RAMOS and Erlenmeyer flasks showed that the gain in mycosubtilin productivity could be lost in the case of too severe oxygen limitations. Indeed, an increase of the rate of mycosubtilin synthesis was observed when the strength of definite oxygen limitation increased from 0.04 to 0.24. Further experiments led in non-monitored flasks between FVR of 0.05 and 0.2 confirmed this result. These latter experiments allowed the testing of a higher FVR of 0.4 which led to a dramatic drop in the lipopeptide synthesis. Considering the oxygen positive effect, a 25-fold increase of the mycosubtilin productivity was observed at a FVR of 0.24 compared to a FVR of 0.04. Hbid et al., 1996, observed an increase of the iturin A production rate as the stirring decreased in the bioreactor, *i.e.* as the dissolved oxygen was lowered. It is known that iturinA and mycosubtilin have almost the same structure while the amino acids at positions 6 and 7, D-Ser→L-Asn, are inverted in iturin A. Consequently, the positive oxygen regulation observed for the mycosubtilin synthesis in ATCC6633 could be found in the iturin A producing strain, *B. subtilis* S499.

In oxygen-monitored flasks, no effect of oxygen could be found for the BBG100 strain carrying the constitutive  $P_{repU}$  promoter instead of the native  $P_{myc}$ . It was suggested that oxygen metabolism could interfere in the regulation of the native  $P_{myc}$  promoter. At the beginning of the oxygen-limited growths of ATCC6633, a constant expression of *fenF* was found at FVR of 0.05, 0.1 and 0.2. Interestingly, a slight decrease of *fenF* expression was observed at FVR of 0.4 with respect to the low value of the mycosubtilin synthesis. The different mycosubtilin isoform patterns obtained for the different oxygen-limited growths could express an indirect influence of OTR on lipopeptide synthesis.

It was also shown in RAMOS experiments that surfactin production by the mycosubtilin overproducing strain BBG100 was lowered in comparison to ATCC6633. Duitman et al., 2007 showed that the expression of both lipopeptides was clearly not coordinated as the *srfA* operon was mainly regulated by the response regulator ComA and the *myc* operon was primarily regulated by the transition state regulator AbrB. However mycosubtilin and surfactin synthetases require an identical cofactor, the 4'-phosphopantetheinate, which transfer is catalysed by the product of the gene *sfp* which encode a 4'-phosphopantetheinyl transferase. This activation step could be limiting for surfactin synthetase when mycosubtilin synthetase is overproduced.

To end with, the diminution of surfactin concentration observed during the RAMOS culture at a FV of 10, 25 and 42 ml is not yet explained. It could result from a re-use of the surfactin as

a substrate by the strain since it appeared only in culture where carbon source depletion was previously observed.

## Conclusion

This study showed that definite oxygen metabolism effectively modulates the synthesis of a NRPS lipopeptide in *B. subtilis* ATCC6633. For the first time, the difficulty of monitoring the bacteria respiration during the production process of a biosurfactant was overcome. It highlights in particular the high potential of RAMOS system for physiological studies on biosurfactant synthesis.

## Acknowledgements

This work received the financial support from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the European Funds for the Regional Development. Authors thank A.S. Druchbert from the functional genomic platform of IFR114-IMPRT for technical assistance.

## References

- Anderlei, T., Zang, W., Papaspyrou, M., Büchs, J. (2004) Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks. *Biochem. Eng. J.* 17, 187-194.
- Arbige, M.V., Bulthuis, B.A., Schultz, J., Crabb, D. (1993) Fermentation of *Bacillus*. In Losick, R. (eds.), *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. Washington DC: Amer. Society for Microbiology 60, 871-895.
- Bonmatin, J.M., Laprevote, O., Peypoux, F. (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinat. Chem. High Throughput Screen.* 6, 541-556.
- Çalik, P., Çalik, G., Özdamar, T.H. (2000) Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Bioeng.* 69(3), 301-311.

- Clark, J.B., Munnecke, D.M., Jenneman, G.E. (1981) In situ microbial enhancement of oil recovery. *Devel. Ind. Microbiol.* 22, 695-701.
- Desai, J.D. and Banat, I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 61, 47-64.
- Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F. and Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *PNAS.* 96(23), 13294-13299.
- Duitman, E.H., Dobek, W., Boven, L.G., Venema, G., Kuipers O.P. and Hamoen L.W. (2007) Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(11), 3490-3496.
- Grünewald, J. and Marahiel, M.A. (2006) Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 70(1), 121-146.
- Guez, J.S., Leclere V, Bechet, M., Joiris, H., Jacques, P. (2004) Influence of pH on the production of mycosubtilin, an antifungal metabolite from *Bacillus subtilis* with potential applications in agro-food sector. Poster presented at the International Congress on Bioprocesses in Food industries (ICBF). July 11-13, 2004, Clermont-Ferrand, France.
- Guez J.S., Chenikher S., Cassar J.Ph., Jacques P. (2007) Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *J. Biotechnol.* 131, 67-75.

- Hbid, C., Jacques, P., Razafindralambo, H., Mpoyo, M.K., Meurice, E., Paquot, M., Thonart, P. (1996) Influence of the production of two lipopeptides, Iturin A and Surfactin S1, on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. *Appl. Biochem. Microbiol.* 57-58, 571-579.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999) Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Appl. Biochem. Biotech.* 77, 223-233.
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P. (2005) Characterization of a constitutive mycosubtilin overproducing *Bacillus subtilis* strain and its antagonistic activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(8), 4577-4584.
- Lee, B.S. and Kim, E.K. (2004) Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enz. Microb. Tech.* 35, 639-647.
- Maget-Dana, R. and Peypoux, F. (1994) Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: Biological and physicochemical properties. *Toxicology.* 87(1-3), 151-174
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M. (1993) Effect of temperature change and aeration on the production of the antifungal peptide antibiotic iturin by *Bacillus subtilis* NB22 in liquid cultivation. *J. Ferment. Bioeng.* 75(6), 463-465.
- Schneider, J., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Deleu, M., Thonart, P., Jacques, P. (1999) The structure of two fengycins from *Bacillus subtilis* S499. *Z. Naturforsch. C* 54(11), 859-865.
- Sen, R. and Swaminathan, T. (1997) Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 358-363.

Figure 1: Evolution of oxygen transfer rate (OTR), expressed in  $\text{mol O}_2 \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , during growth of *B. subtilis* ATCC6633 in RAMOS flasks with a filling volume (FV) of 10 ml (-♦-), 25 ml (-■-), 42 ml (-▲-) and 60 ml (-●-). Displayed data corresponds to four experiments led simultaneously and experiment with a FV of 42 ml is a representative of a triplicate set.

Figure 2: Evolution of the mycosubtilin (A and B) and surfactin (C and D) production expressed in  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$  during growth-limited cultures of *B. subtilis* ATCC6633 and BBG100 in RAMOS flasks with different filling volumes of 10 ml (-♦-), 25 ml (-■-), 42 ml (-▲-), 60 ml (-●-). Displayed kinetics data corresponds to one RAMOS and three non-monitored flasks experiments led simultaneously in order to avoid the modification of the FV.

Figure 3: Effect of different oxygen-limited growths obtained in flasks with different filling volume ratios (FVR) of 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 on the expression of the *fenF* gene of *B. subtilis* ATCC6633. Comparative RT-PCR gels for *fenF* and *rplL* and the *rplL* normalised MTM ratios for *fenF* are presented for doubling times (n) of 2 and 4. Culture medium is the modified Landy medium buffered with MOPS 100 mM at pH 7.0. Data corresponding to n=2 and n=4 originates from two independent experiments in order to avoid the modification of the FV.

Figure 4 : Evolution of the mycosubtilin production (expressed in  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) and isoform patterns for cultures of *B. subtilis* ATCC6633 led at FVR of 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4. Data are representative of two independent experiments at 24 h.

Table 1: Measured values of the pH, optical density at 600 nm, glucose, glutamic acid and mycosubtilin concentrations after 48 h of culture at 30°C and shaking at 175 rpm in the RAMOS. Displayed data corresponds to experiments led simultaneously at different filling volumes of 10, 25, 42 and 60 ml.

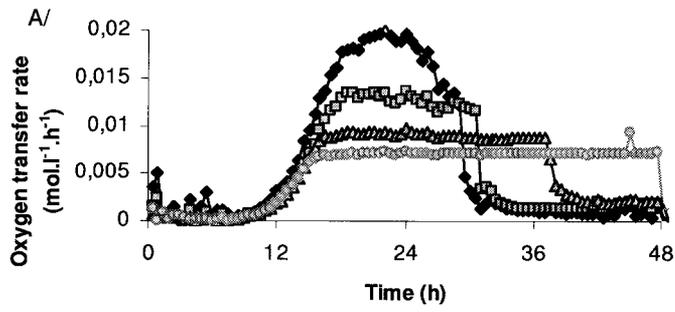


Figure 1

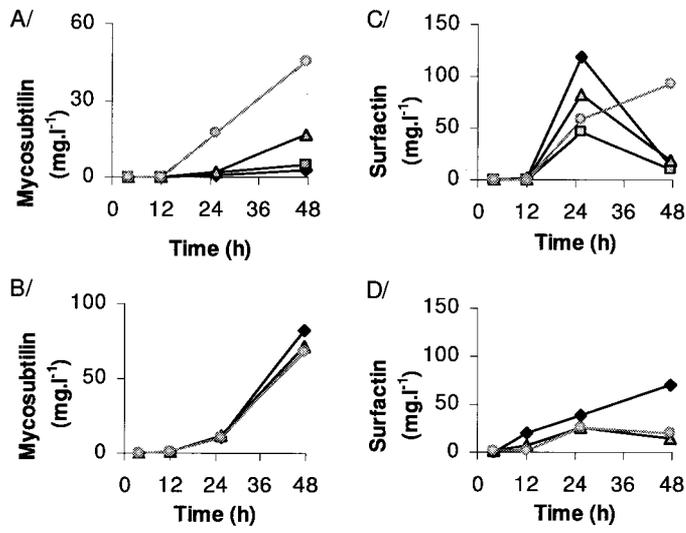
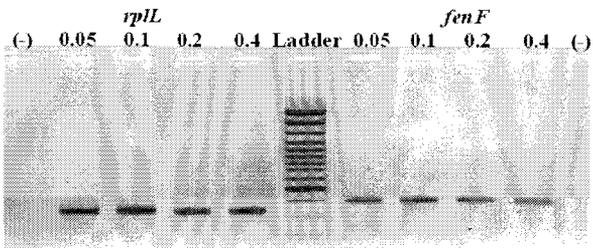
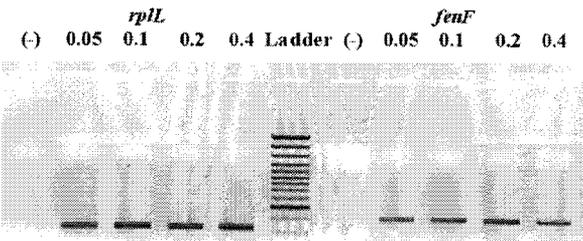


Figure 2



Doubling times (n=2)



Doubling times (n = 4)

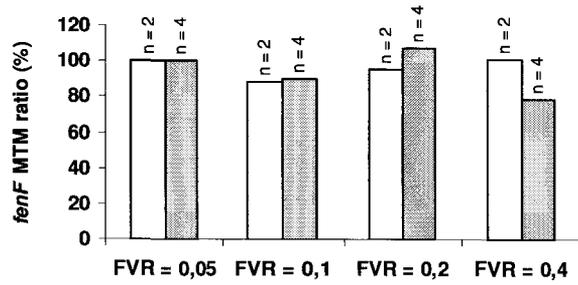


Figure 3

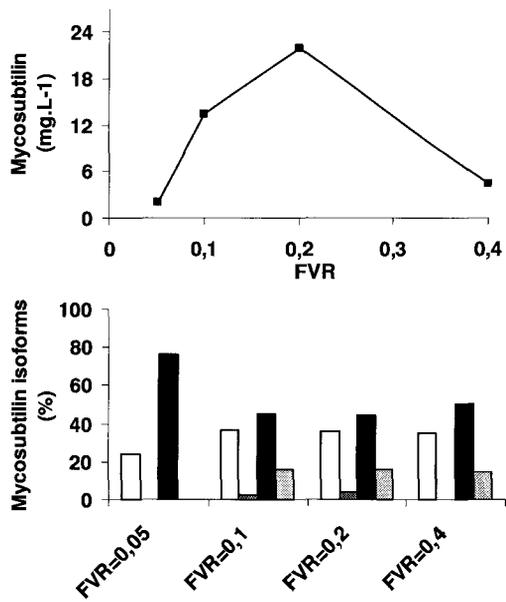


Figure 4

Table 1

Strain	Filling Volume (ml)	pH	OD	Glucose (g.l <sup>-1</sup> )	Glutamic acid (g.l <sup>-1</sup> )	mycosubtilin (mg.l <sup>-1</sup> )	q <sub>p</sub> (mg.g (DW) <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
6633	10	6.02	15.2	0	0.017	2.8	0.001
	25	6.06	14.9	0	0.021	4.7	0.002
	42	6.08	18.1	0	0.034	16.9	0.006
	60	6.07	11.2	0.45	0.056	45.4	0.025
BBG100	10	5.96	15.7	0.07	0.016	82.2	0.033
	42	5.88	12.2	2.8	0.039	72	0.037
	60	6.10	12.3	2.4	0.028	67.9	0.035

**ANNEXE 4**

**Temperature dependence of mycosubtilin homologues production in**

***Bacillus subtilis* ATCC 6633**

**Patrick Fickers, Valérie Leclère, Jean-Sébastien Guez, Max Béchet,  
Philippe Jacques \***

Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM,  
UPRES EA 1026), Polytech'Lille, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655  
Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Patrick Fickers : pfickers@ulg.ac.be

Valérie Leclère : valerie.leclere@univ-lille1.fr

Jean-Sébastien Guez : Jean-Sebastien.Guez@polytech-lille.fr

Max Béchet : max.bechet@univ-lille1.fr

Philippe Jacques : philippe.jacques@polytech-lille.fr \*Correspondence and reprints

## Abstract

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 produce mycosubtilin, a non-ribosomally synthesized lipopeptide of the iturin family which presents antagonistic activities against various phytopathogens. Different homologues with fatty acid moiety varying from C<sub>15</sub> to C<sub>17</sub> are usually co-produced with their biological activities increasing with the number of carbon in the fatty acid chain. In the present report, we highlight that growth temperature modulates either the level of the mycosubtilin production and the relative abundance of the different homologues. Indeed, a 30-fold increased mycosubtilin production was observed when the temperature was decreased from 37°C to 25°C for both the *B. subtilis* ATCC 6633 strain and BBG100, a constitutive mycosubtilin over-producer. However, no significant difference in the expression of the mycosubtilin synthetase encoding genes could be observed suggesting that the observed phenotype originates from a higher mycosubtilin synthetase turnover at lower temperature. We also point out that lower growth temperature led to an increased proportion of odd-numbered fatty acid homologue as a consequence of the *de novo* synthesis C<sub>17</sub> anteiso fatty acid following the cell adaptation to low temperature.

Keywords : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mycosubtilin, odd-numbered fatty acids, temperature

## 1. Introduction

Members of the *Bacillus subtilis* family produce a wide variety of antibacterial and antifungal antibiotics (for review see (1)). Some of them, such as bacilysin, chlorotetain, mycobacillin, difficidin and lipopeptides are formed by nonribosomal peptide synthetases and/or polyketides synthetases. The lipopeptides belonging to the surfactins, iturins and

fengycins families (2) are amphiphilic cyclic peptides composed of seven  $\alpha$ -amino acids (surfactin and iturins) or ten  $\alpha$ -amino acids (Schneider *et al.*, 1999) linked to one unique  $\beta$ -amino fatty acid (iturins) or  $\beta$ -hydroxy fatty acids (surfactins and fengycins). The length of the fatty acid moiety may vary from C<sub>13</sub> to C<sub>16</sub> for surfactin, from C<sub>14</sub> to C<sub>17</sub> for iturins and from C<sub>14</sub> to C<sub>18</sub> in the case of fengycin. Different homologous compounds with a linear or branched fatty acid moiety are usually co-produced for each lipopeptide family (Akpa *et al.*, 2001).

*B. subtilis* ATCC 6633 produces subtilin (Duitman *et al.*, 1999), subtilosin (Strein *et al.* 2004), rhizocticin (Kugler *et al.* 1990), and two lipopeptides, surfactin and mycosubtilin, a member of the iturin family (Duitman *et al.*, 1999). Mass spectrometry analyses of *B. subtilis* ATCC 6633 supernatant cultured at 30 °C revealed that the two main mycosubtilin homologues produced belong to C<sub>16</sub> and C<sub>17</sub> homologues (Leclère *et al.*, 2005). The mycosubtilin gene cluster spans about 38 kb and consists of four ORFs designated *fenF* and *mycA*, *mycB* and *mycC*, all of them being under control of the *myc* promoter (Duitman *et al.*, 1999). The subunits encoded by the three *myc* genes contain the seven modules necessary to synthesize the peptide moiety of mycosubtilin. They show strong similarity with members of the peptide synthase family and display the ordered assembly of conserved condensation, adenylation, and thiolation domains. Iturins present a strong fungitoxic activity against different phytopathogens such as *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Pythium aphanidernatum*. Biological activities of iturins have been shown to increase with the number of carbon atoms in the fatty acid chain. Indeed, C<sub>17</sub> homologues are 20-fold more active against pathogens than the C<sub>14</sub> isoform (Jacques *et al.* 1999, Touré *et al.* 2004).

Of the biological control alternatives to chemical pesticides used for reducing plants diseases, the application of non-pathogenic soil bacteria living in association with plant roots

is promising. These bacteria can antagonize fungal pathogens by producing low-molecular-weight fungitoxic compounds, such as the above-mentioned lipopeptides. We recently highlighted in biocontrol assays, conducted with tomato/*Pythium* pathosystem, that pre-treatment of tomato seeds with the mycosubtilin-overproducing derivative BBG100 prior to planting led to enhanced seedling emergence. This demonstrated that mycosubtilin gained protection against *Pythium* damping-off of tomato seedlings (Leclere et al 2005).

In the present study, we demonstrate that growth temperature modulates either the level of mycosubtilin production and the relative abundance of the different homologues produced.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Plasmids, strains and media*

Plasmids, oligonucleotides and *B. subtilis* strains used in this study are listed in Table 1. *E. coli* strain DH5 $\alpha$  (Promega), used for transformation and amplification of recombinant plasmid DNA, was grown at 37 °C in Luria-Bertani medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml) or chloramphenicol (5  $\mu$ g/ml) when required. Conventional calcium-shock procedure was used for *E. coli* transformation (Sambrook et al 1989) whereas *B. subtilis* was transformed as described elsewhere (Jarmer et al 2002). All liquid cultures were performed in Landy medium (Landy *et al.*, 1948).  $\alpha$ -amylase activity was detected by growing *Bacillus* colonies overnight on LB plates containing 1% soluble starch and staining plates with iodine as described elsewhere (Dahl and Meinhof, 1994). Microbial growth was monitored by dry weight (DW) determination.

### *2.2. DNA manipulation*

Standard molecular genetic techniques were used (Sambrook et al., 1989). Restriction enzymes were obtained from Fermentas GMBH (St. Leon-Rot, Germany) or New England Biolabs (Beverly, MS). PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany). Plasmid DNA was extracted and purified from *E. coli* with the QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). DNA fragments were purified from agarose gels using the Qiagen Gel Extraction Kit. Arrow Taq polymerase (Qbiogene, Montreal, Canada) was used for polymerase chain reaction as recommended by the manufacturer.

### 2.3. Construction of strain BBG117

To measure the expression of the *myc* operon, a *lacZ*-reporter gene was obtained using vector pDG1661 which contains the ribosomal binding site of the *B. subtilis spoVG* gene fused to a promoter-less *LacZ* cassette (Guérout-Fleury et al. 1996). The *myc* promoter fragment to be tested was obtained by PCR using the primers pMYCfo and pMYCrev (Table 1), and then subcloned into pGEM-T Easy vector to generate pBG107. This latter was *EcoRI*-*Bam*HI digested and a 942-bp fragment was subcloned into pDG1661 at the corresponding sites to yield pBG111. This latter was used to insert the reporter construct into the *B. subtilis* ATCC 6633 *amyE* locus, giving rise to strain BBG117. Correct integration was verified either by the loss of amylase activity and by analytical PCR using primers the AmyEfo and AmyERev (Table 1).

### 2.4 $\beta$ -galactosidase assays

$\beta$ -galactosidase activities were measured using the method of Miller (Bazill et Karamata, 1972) on cell extracts prepared by chloroform treatment and centrifugation. Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using the Bio-Rad protein

assay solution (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). One unit of  $\beta$ -galactosidase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1 nmole of o-nitrophenol  $\text{min}^{-1}$  at 37°C.

### 2.5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and comparative PCR

Total RNAs were isolated from culture cells as described elsewhere (Guez et al, in preparation) and mRNA integrity was estimated on an Agilent 2100 Bioanalyser equipped with a RNA 6000 nanoLabChip. Extracted RNAs were then subjected to reverse transcription with Superscript II reverse transcriptase as recommended by the manufacturer (Invitrogen, Carlsbad, CA). *fenF*, *rplL* and *cspB* cDNAs were PCR-amplified using the primer pairs *fenF*fo/*fenF*rev, *rplL*fo/*rplL*rev and *cspB*fo/*cspB*rev, respectively. The PCR products were analysed by electrophoresis on a 1.5% agarose gels and visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments were quantified by scanning densitometry and the Median-base Trimmed Mean density (MTM) was determined with Arrayvision software (GE Healthcare, Upsalla, Sweden).

### 2.6. Lipopeptides purification and identification

1 ml culture samples were centrifuged at 13 000 x g before being loaded onto C<sub>18</sub> Maxi-Clean cartridges (1 ml bead volume, Alltech, Deerfield, IL), washed successively with 8 ml of water and 8 ml of H<sub>2</sub>O/methanol mixture (1:1, v/v). Lipopeptides were then eluted with 5 ml pure methanol, dried under vacuum and resuspended in 100  $\mu$ l of methanol. Mycosubtilin concentration was determined by RP-HPLC on a Waters apparatus using a VYDAC 218 TP C<sub>18</sub> column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ M packing, VYDAC, Hesperia, CA). The mobile phase was a acetonitrile/H<sub>2</sub>O/trifluoroacetic acid mixture (40:60:0.5, v/v/v). Samples

(20  $\mu$ l) were eluted at a flow rate of 1 ml min<sup>-1</sup>. Purified iturins standard were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The retention time and the second derivatives of UV-visible spectra (Waters PDA 996 diode array; Millenium software) of each peak were used to identify the eluted molecules as described elsewhere (Leclère *et al.*, 2005). For normalization, data were expressed as a pourcentage of the highest obtained value.

### 3. Results

#### 3.1 Influence of the culture temperature on mycosubtilin production

Mycosubtilin production was measured after 72 h of culture at different temperature for the *B. subtilis* wild-type strain ATCC 6633 and BBG100, a constitutive mycosubtilin overproducing derivative (Leclere et al 2005). As shown in Fig 1a, the mycosubtilin production decreased in a temperature-dependant manner for both strains. Indeed, the mycosubtilin concentration in the culture broth decreased from 28 mg (mg DW)<sup>-1</sup> at 25 °C to 1 mg (mg DW)<sup>-1</sup> at 37 °C for the wild-type strain ATCC 6633, whereas it decreased from 123 mg (mg DW)<sup>-1</sup> to 16 mg (mg DW)<sup>-1</sup> for BBG100 in the same conditions. For both strains, a regression analysis between the mycosubtilin concentration and the temperature led to a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0,99 and 0,98 for ATCC 6633 and BBG100, respectively. This demonstrated a direct relation between the production of mycosubtilin and the growth temperature. Similar analysis on the normalized mycosubtilin values led to a similar regression slope for both strains (Fig 1b). This showed that the temprature dependency of mycosubtilin production is equivalent whatever the level of mycosubtilin production.

#### 3.3. Influence of the culture temperature on myc expression.

The multienzymatic complex involved in mycosubtilin biosynthesis is encoded by the *myc* operon. To further characterize the influence of growth temperature on mycosubtilin production, a *myc-lacZ* reporter gene fusion was constructed and the expression of *myc* was determined at different temperatures. As a few information is available on the *myc* promoter sequence, the intergenic region between the upstream *pbp* gene and *fenF*, the first gene of the *myc* operon was cloned and fused to a *spoVG-lacZ* promoter-less cassette.

Strain BBG117, a *B. subtilis* ATCC 6633 derivative containing the *myc-lacZ* reporter fusion was grown at different temperatures and the  $\beta$ -galactosidase activity was measured. Samples were collected at different time periods corresponding : (i) to the exponential growth phase, (ii) to the transition from the exponential to the stationery phase and (iii) to the stationery phase. As shown in Figure 2, the level of  $\beta$ -galactosidase activities were maximal in the samples collected during the transition phase, suggesting that *myc* expression is maximal at that culture period. The expression of *myc* then decrease during the stationery phase. However, for all the temperatures tested, the  $\beta$ -galactosidase activity profiles were not significantly different, indicating that *myc* expression seems to be temperature independent.

To further characterize the influence of the temperature on *myc* expression, the mRNA of *fenf*, the first ORF of the *myc* operon, was quantified in cold stress condition and compared to that obtained at 37°C. Therefore, mRNAs of *fenF* and *cspB*, encoding the major cold shock protein, were quantified by RT-PCR using, *rplL* mRNA, encoding the ribosomal protein L12, for data normalization. As shown in Figure 3, the significant increase in the mRNA level observed for *cspB* at 20 °C traduced a cold shock response of *B. subtilis* ATCC 6633 under those conditions. However, at this low temperature no significant differences in the *fenF* mRNA level could be observed as compare to the one observed at 37°C. This demonstrated that *myc* expression is not affected at low temperature.

### 3.2. Mycosubtilin homologues production

Changes in membrane lipid composition, and thus in the intracellular pool of fatty acids is one of the known consequences of the cell adaptation to low temperature. Since mycosubtilin contains a fatty acid moiety, we wanted to determine if the proportions of the different mycosubtilin homologues were also affected by temperature. Therefore, these proportions were measured after 72 h of growth for *B. subtilis* strains ATCC 6633 and BBG100 cultured at 25, 30 and 37°C. As shown in Figure 4, a significant increase in the proportion of mycosubtilin with odd-numbered fatty acids (*i.e.* C15 and C17) could be observed at lower temperature for both strains. By contrast, the proportion of the C<sub>16</sub> fatty acid homologue decreased in these conditions. Production of odd-numbered fatty acid homologues also seems to be affected by the mycosubtilin production yield. Indeed, for the mycosubtilin over-producer BBG100, the C17 homologue represented 80% and 77% of the total mycosubtilin production at 25 and 30°C, respectively, whereas these proportions fall to 71 % and 63 % for the wild-type strain ATCC 6633, under the same conditions (Table 2).

To confirm the increase in the production of mycosubtilin with long chain fatty acid at low temperature, we performed cold shock experiments. Both *B. subtilis* ATCC 6633 and BBG100 strains were first cultured at 30°C for 8 h before being shifted to 25°C for 64 h. Lipopeptide production and homologues composition were then analysed and compared to those obtained for the cultures performed at 25 and 30°C for 72 h. As it was previously observed, significant differences in the proportion of the mycosubtilin homologue produced occurred for the cultures performed for 72 h at 25 and 30°C (Table 2). In addition, the differences in the C16 and C17 homologues proportions were more marked for the shifted culture than those obtained at 25°C (Table 2). Indeed, for BBG100, the C16/C17 homologue

ratio were equal to 0,25 at 25°C and 0,12 for the shifted culture, whereas these ratio are equal to 0,41 and 0,22 for the wild-type strain under the same conditions. This could result from a stronger response of the cell metabolism (*i.e.* a higher production of odd-numbered fatty acids) after cold stress. In all cases, the increase in odd-numbered homologue at 25 °C and after cold shock was mainly due to an increase in the synthesis of mycosubtilin with branched fatty acids moiety. Similar cold shock experiments from 38 to 30°C performed with BBG100 yielded similar results (data not shown).

#### 4. Discussion

In its natural environment, the surface layer of soil, *B. subtilis* is exposed to temperature fluctuations which induce modifications in its physiology and metabolism. At lower temperature, cells must face several problems, including low membrane fluidity, reduced enzyme activities, decreased initiation of translation due to stabilized secondary structures of mRNAs or slower protein folding (Graumann et Marahiel, 1999). Fatty acids are one of the most important building blocks of cellular materials. In *B. subtilis*, the membrane composition is characterized by a fatty acid profile dominated to a large extent by odd-numbered branched-chain fatty acids, with the major C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> species (Kaneda, 1977). These latter were shown to play a major role in the correct physical state of the membrane lipids, which is required for optimal membrane structure and function. At lower temperature, the membrane fluidity must increase to avoid transition from a liquid crystalline into a gel-like phase state of the lipid bilayer. *Bacillus* cells respond to a decrease in the growth temperature by desaturating the fatty acids of their membrane lipids through the activation of the *Des* pathway (Mendoza et al 2001) and by increasing the proportion of ante-iso branched fatty acids which present a lower melting point (Suutari and Laasko, 1991, Klein et al. 1999).

However, it was shown that the deletion of the *des* genes does not lead to any detectable phenotype after cold shock, indicating that *B. subtilis* rather adapts to low temperature by modifying its iso- and anteiso-fatty acid membrane composition. These modifications must involve *de novo* fatty acid synthesis. Anteiso-methyl branches cannot be added by methylation of existing fatty acids, but are introduced as part of the primer molecule during the initiation of fatty acid synthesis. Anteiso-branched C15 and C17 fatty acids are formed from  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvalerate and 2-methyl-butyryl-CoA, which both derives from isoleucine. These modifications of the membrane composition at low temperature were demonstrated in *B. subtilis* JH642 by Klein and coll (1999). Their results suggested a *de novo* synthesis of anteiso C15:0 and C17:0 fatty acids from isoleucine or threonine present in the culture medium as a response to a cold stress.

In the first step of the mycosubtilin synthesis pathway, the acyl CoA-ligase domain of *myc* couples coenzyme A to a cytoplasmic long chain fatty acid. The activated fatty acid is then transferred to the 4-phosphopantetheine cofactor of the first acyl carrier domain of the mycosubtilin synthase. In subsequent reaction of condensation, adenylation and thiolation reactions, the mycosubtilin molecule is synthesized analogous to other nonribosomal peptides (Duitman *et al.*, 1999). It was also recently demonstrated by chaise experiments that some flexibility exist in the length of fatty acid group incorporated in mycosubtilin molecules (Hansen et al 2007). All of these suggest that the predominant fatty acid homologue present in the cytoplasmic pool compatible with the lipopeptide structure is preferentially incorporated. Therefore, the variation in the composition of this pool following a temperature modification should also influence the production of mycosubtilin in the same manner. Our results are clearly supportive with this hypothesis since both low growth temperature or cold shock, favouring *de novo* synthesis of odd-numbered fatty acids, led to an increased production of

mycosubtilin with a C<sub>15</sub> and C<sub>17</sub> fatty acid moiety. In addition, low growth temperature was also shown to significantly increase the mycosubtilin production yield. Our results suggest that this increase was not due to an overexpression of *myc* at low temperature since (i) *myc* induction and the concentration of the resulting mRNA were not modified at low temperature; (ii) the increase of mycosubtilin production was also observed for the constitutive producer BBG100. Therefore, this increased level of production could rather results from a higher turn over of the mycosubtilin synthetase at low temperature. This hypothesis is reinforced by the fact that a similar temperature dependence was observed whatever the level of mycosubtilin production. This over-production at low temperature is consistent with previous finding observed for *B. subtilis* RB14 in solid-state fermentation for an other iturin, iturin A (Ohno et al 1995, Mizumoto and Shoda 2007).

Lipopeptides were reported to be a key parameter in biofilm formation and rhizosphere colonization. Therefore, the production of the most active homologue in large amount facilitate these phenomenons. When considering that the temperature in the rhyzosphere is rather close to 20 than 37 °C, it is no surprinsing that the lipopeptide production mechanism seems to be adapted to those low temperatures.

## References

- [1] Akpa, E., Jacques, P., Wathelet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H., Thonart, P. (2001) Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93, 551-561.
- [2] Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- [3] Dahl, M., Meinhof, C. (1994) A series of integrative plasmids for *Bacillus subtilis* containing unique cloning sites in all three open reading frames for translational *lacZ* fusions. *Gene* 145, 151-152.
- [4] de Mendoza, D., Grau, R., Cronan, J. (1993) In : A. Sonenshein, J. Hoch, R. Losik (Eds), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington D.C, pp411-424.
- [5] Duitman, E. H., Hamoen, L. W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 13294-3299.
- [6] Graumann, P. L., Marahiel, M. A. (1999) Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 203-209.
- [7] Guerout-Fleury, A. M., Frandsen, N., Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180, 57-61.
- [8] Hansen, D., Bumpus, S., Aron, Z., Kellher, N., Walsh, C. (2007) The loading module of mycosubtilin: an adenylation domain with fatty acid selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* 6366-6367.
- [9] Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., Thonart, P. (1999) Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plachett-Burman design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 223-233.
- [10] Jarmer, H., Berka, R., Knudsen, S., Saxild, H. (2002) Transcriptome analysis documents induced competence of *Bacillus subtilis* during nitrogen limiting conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 206, 197-200.

- [11] Kaneda, T. (1977) Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol. Rev.* 41, 391-418.
- [12] Klein, W., Weber, M. H., Marahiel, M. A. (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J. Bacteriol.* 181, 5341-5349.
- [13] Kugler, M., Loeffler, W., Rapp, C., Kern, A., Jung, G. (1990) Rhizocticin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Arch. Microbiol.* 153, 276-281.
- [14] Landy, M., Warren, H., Roseman, S., Golio, L. (1948) Bacillomycin, an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 67, 539-541.
- [15] Leclere, V., Bechet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Jacques, P. (2005) .Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4577-4584
- [16] Mizumoto, S., Shoda, M. (2007) Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 101-108.
- [17] Nishio, C., Komura, S., Kurahashi, K. (1983) Peptide antibiotic subtilin is synthesized via precursor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 751-758.
- [18] Ohno, A., Ano, T., Shoda, M. (1995) Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RD14, in solid-state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 517-519.

- [19] Sambrook, J., Russel, D. (2001) *Molecular cloning :a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY).
- [20] Stein, T., Dusterhus, S., Stroh, A., Entian, K. D. (2004) Subtilosin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster, *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2349-2353.
- [21] Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions, *Mol. Microbiol.* 56, 845-857.
- [22] Suutari, M., and Laakso, S. (1992) Unsaturated and branched chain-fatty acids in temperature adaptation of *Bacillus subtilis* and *Bacillus megaterium*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1126, 119-124.
- [23] Toure, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A., Thonart, P. (2004) Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1151-1160.
- [24] Zuber, P., Nakano, M., Marahiel, M. (1993) In : A. Sonenshein, J. Hoch, R. Losik (Eds), *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 897-916.

### Figures legends.

**Fig. 1** : Mycosubtilin productivity of *B. subtilis* ATCC 6633 obtained after 72 h of growth in Landy medium at 25, 30 and 38°C. The data are mean values of three independent experiments. A : raw values ; B: normalized values.

**Fig. 2**.  $\beta$ -galactosidase activity determined for BBG117 after 4, 6 and 8 h of growth in Landy medium at 25, 30 and 38°C. Mean values and standard deviations were obtained from three independent experiments.

**Fig. 3.** Temperature effects on the expression of *rplL*, *fenF* and *cspB*. A: Electrophoretic profile of purified mRNAs subjected to RT-PCR. B: value of gene expression obtained after scanning densitometry and normalization for value obtained with *rplL*.

**Fig. 4.** Relative abundance of the C<sub>15</sub> (black), C<sub>16</sub> (Fleischmann *et al.*, 1995) and C<sub>17</sub> (Toure *et al.*, 2004) mycosubtilin homologues determined for *B. subtilis* ATCC 6633 (A) and the mycosubtilin overproducing strain BBG100 (B) after 72 h of growth in Landy medium. The data are mean values of three independent experiments. Significance of the difference between the data was determined by a Student's *t*-test at P<0.05.

Table 1

## Plasmids and strains used in this study

Plasmids	Description, structure or sequence (5'-3')	Source, restriction site
pGEM-T Easy	Cloning vector	Promega
pDG1661	Integrative vector at <i>amyE</i> locus	Guérout-Fleury <i>et al</i> 1996
pBG107	<i>pmycS</i> promoter into pGEM-T Easy	This work
pBG111	<i>pmycS</i> - <i>lacZ</i> into pDG1661	This work
Primers		
pMYCfo	CGTCAAGAATTCTTTATCATTCCATATATACG	<i>EcoRI</i>
pMYCrev	CGTCAAGAATTCTTTATCATTCCATATATACG	<i>BamHI</i>
AmyEfo	GGAAGCGGAAGAATGAAGTAAGAGGG	
AmyERev	GGAAGCGGAAGAATGAAGTAAGAGGG	
fenFfo	CAAAATGCAGATCCTGAGCA	
fenFrev	GGCATAGTCATGTGCGTTTG	
rplL fo	GCTTCCGTTAAAGAAGCAACTG	
rplLrev	AGAAGCGCCAACCTTCTTCAA	
cspB Fo	AAAAGGTTTCGGATTCATCG	
cspBrev	AACGTTAGCAGCTTGTGGTC	
<i>B. subtilis</i> strains		
ATCC 6633	wt	Lab stock
BBG100	ATCC 6633 <i>mycS</i> controlled by <i>repU</i> promoter	Leclère <i>et al</i> 2005
BBG117	ATCC 6633 <i>amyE::pmyc-lacZ</i>	This work

Table 2 : Repartition of the C16 and C17 mycosubtilin homologues produced by *B. subtilis* ATCC 6633 cultured for 72 h at 25, 30°C and during temperature schift experiments. B and L are for branched and linear homologue respectively whereas Tot are for the total amount detected. ND : non-determined. Significance of the difference between the data was determined by a Student's *t*-test at P<0.05

Temperature	ATCC 6633		BBG100	
	C16 (%)	C17 (%)	C16 (%)	C17 (%)
	Tot (B/L)	Tot (B/L)	Tot (B/L)	Tot (B/L)
25	29 (ND)	71 (63/8)	20 (ND)	80 (66/14)
30	37 (ND)	63 (53/10)	23 (ND)	77 (57/20)
Down-shift	18 (ND)	80 (69/11)	11 (ND)	89 (69/16)

Figure 1

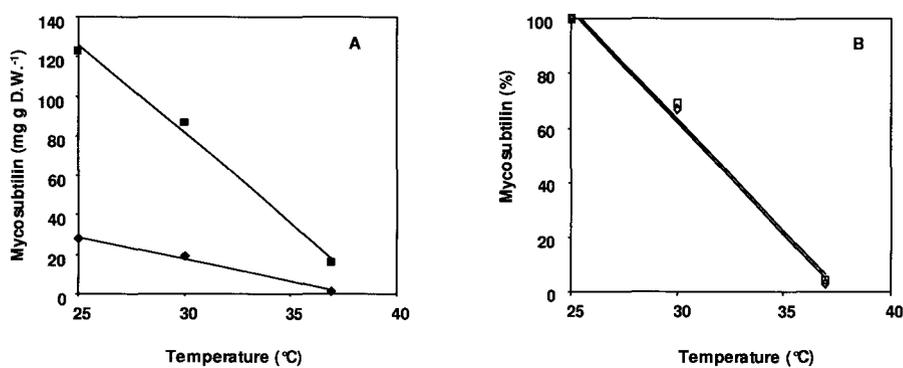


Figure 2

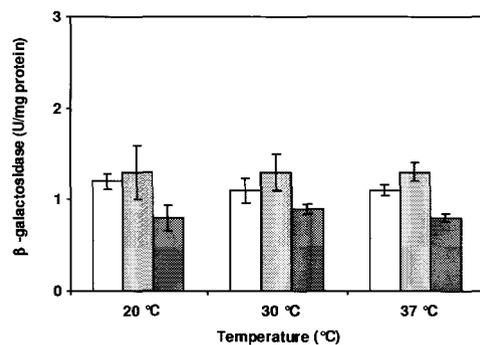


Figure 3

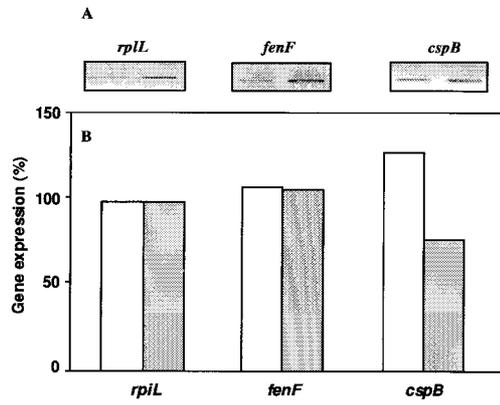
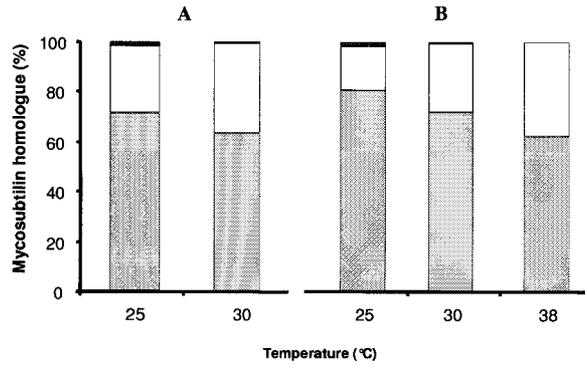


Figure 4



## ANNEXE 5

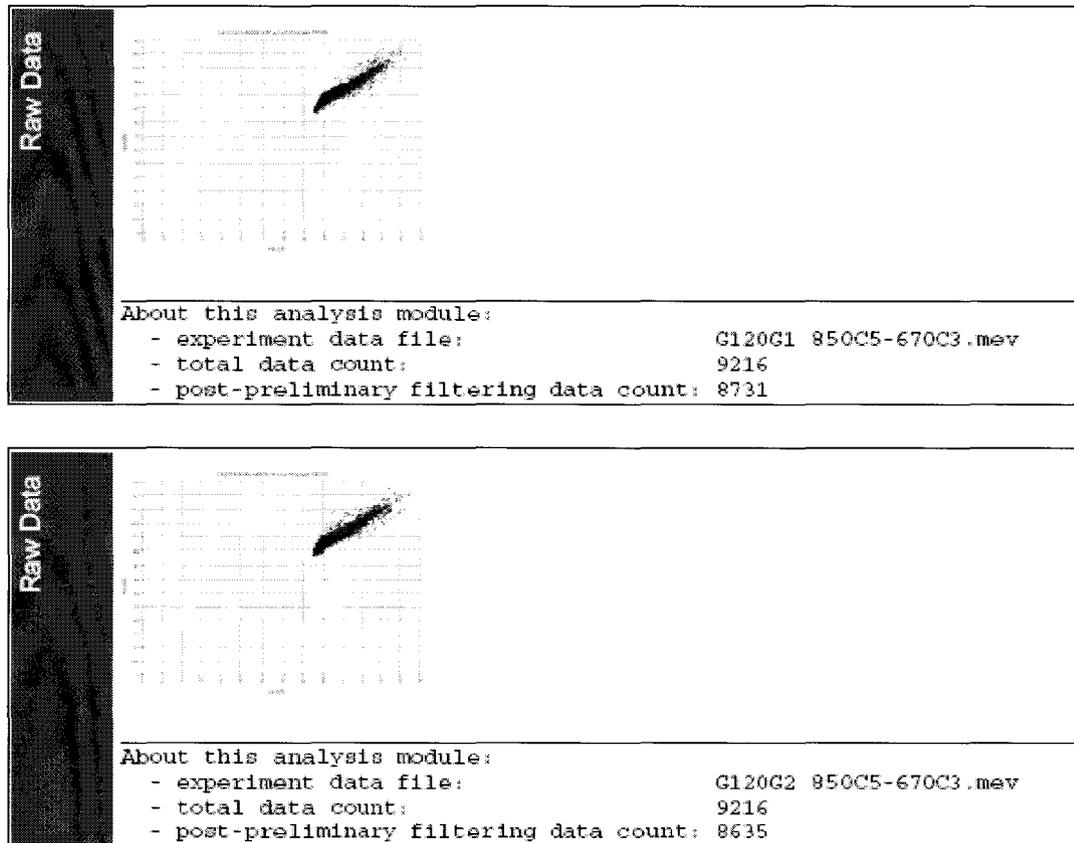
La séquence d'opérations de traitement des cellules issues de la condition témoin et de l'essai décrites au § 4.3.1.1. est réalisée comme suit : extraction des ARNs, contrôle de la quantité et de la qualité des ARNs, transcription inverse et marquage des ARNs par Cy3 et Cy5, hybridation sonde/cibles, lecture au scanner et prétraitement de l'image scannée avec le logiciel Genepix. Les paramètres du traitement des données sous Midas, décrits au § 2.5.4., sont réglés aux niveaux précisés sur la figure A.

<i>Read flip-dye pair(s)</i>	
\ Input file pair(s)	Click to see
\ One Bad Channel Tolerance Policy	Stringent
\ Use channel A flag	Yes
\ Use channel B flag	Yes
\ Channel A background checking	Yes
\ Channel B background checking	Yes
\ Signal/Noise threshold	1.3
<i>Total intensity normalization</i>	
\ Reference	Cy3
<i>Lowess (Locfit) normalization</i>	
\ Mode	block
\ Smooth parameter	0.33
\ Reference	Cy3
<i>Flip dye consistency checking</i>	
\ Data trim option	SD cut
\ Cross log-ratio data keep range	2.0 SD
<i>Slice analysis</i>	
\ Slice data population	50
\ Data keep range lower limit	1.96
\ Data keep range upper limit	Infinity

*Figure A: Valeur des différents paramètres du traitement des données effectué grâce au logiciel Midas à partir des données brutes issues du traitement par le logiciel GenePix des puces hybridées en flip-dye. Les cibles étudiées sont issues de prélèvements réalisées lors de cultures de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié tamponné par du MOPS 100 mM pH 7.0 additionné d'isoleucine à 2 g/L (essai) ou non (témoin).*

Les ARN issus de la condition témoin sont marqués alternativement par Cy3 et Cy5. Les ARN issus de la condition essai sont marqués alternativement par Cy5 et Cy3. Deux lames sont réalisées en croisant le marquage des cibles (flip-dye) de sorte à pouvoir retirer l'effet propre aux marqueurs. Le signal émis par le Cy3 est lue sur la voie A et le signal émis

par le Cy5 sur la voie B. Les résultats des phases principales du traitement des données peuvent être visualisés sur les différents graphiques présentés ci-dessous.



*Figure B: Représentation du logarithme en base 10 des intensités des spots lus par le scanner GenePix à partir des puces hybridées en flyp-dye (G120G1 et G120G2). Les spots représentés ont été conservés après exclusion des spots flaggés et après seuillage du bruit de fond. En haut : condition « témoin » marquée par Cy3 en fonction de la condition « essai » marquée par Cy5. En bas condition essai marquée par Cy3 en fonction de la condition témoin marquée par Cy5. Les cibles étudiées sont issues de prélèvements réalisées lors de cultures de *B. subtilis* BBG100 sur milieu de Landy modifié tamponné par du MOPS 100 mM pH 7.0 additionné d'isoleucine à 2 g/L (essai) ou non (témoin).*

La figure B montre que pour les puces G120G1 et G120G2, 485 et 581 spots seulement sont exclus par le traitement des données après le flagging et le seuillage du bruit de fond. La distribution des spots autour de la bissectrice est homogène rendant compte de la qualité des données.

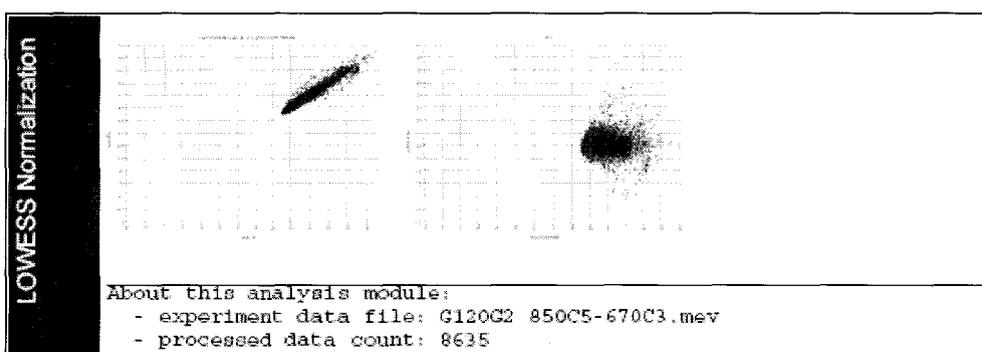
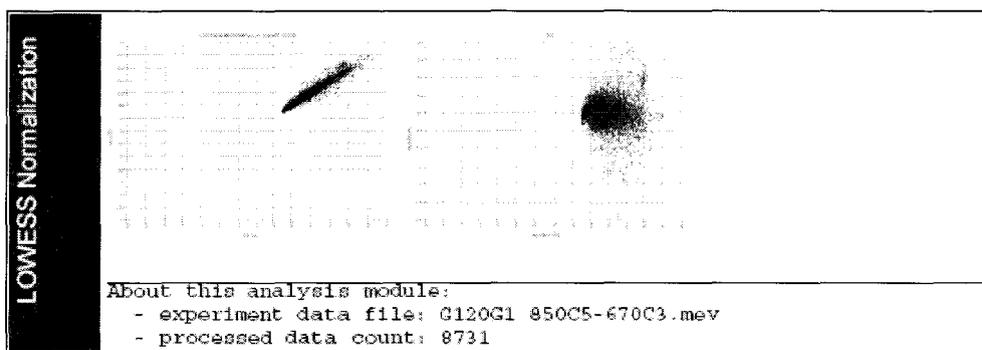


Figure C: Représentation de l'intensité des spots de la figure précédente après traitement par l'algorithme de LOWESS (Local WEighted Smoothing Scatterplot). En haut : condition « témoin » marquée par Cy3 en fonction de la condition « essai » marquée par Cy5. En bas condition essai marquée par Cy3 en fonction de la condition témoin marquée par Cy5. A gauche : représentation en logarithme base 2 des intensités. A droite : représentation du rapport des intensités en base 2 en fonction du produit des intensités en base 10.

Le lissage des données par l'algorithme de LOWESS permet d'homogénéiser la distribution des spots autour de la bissectrice (figure C). Dans notre cas, l'effet du LOWESS est peu marqué en raison de la bonne qualité des données. Il a cependant permis de redresser la forme en cédille du nuage de points observée précédemment pour les valeurs basses d'intensité.

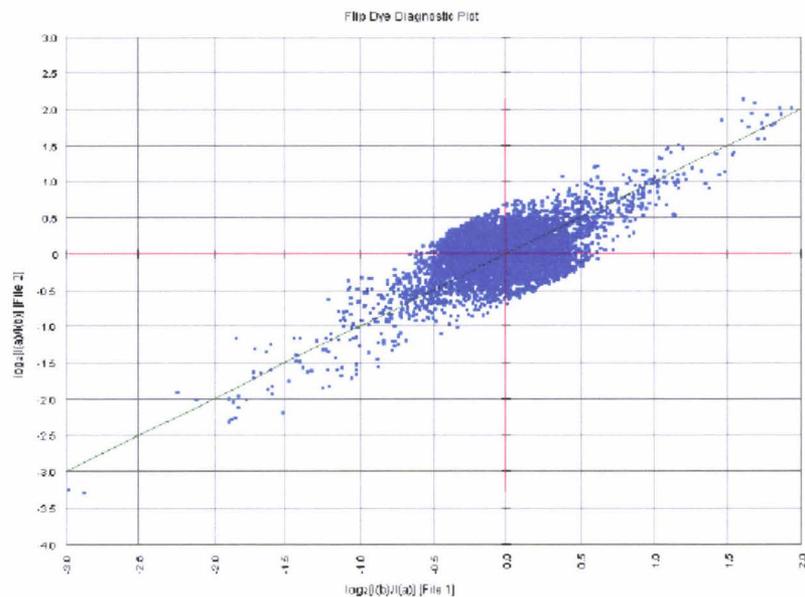
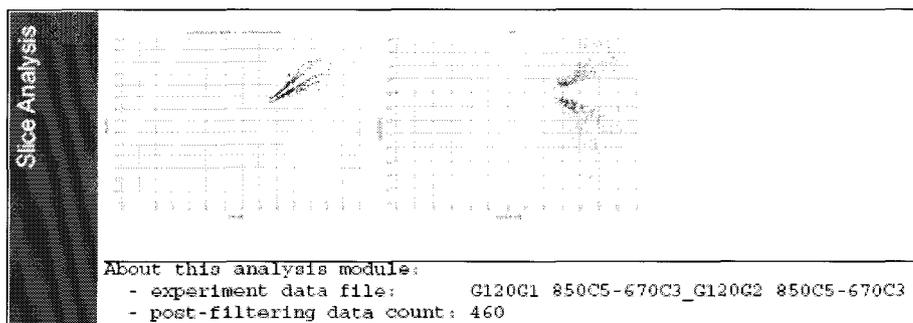


Figure D : Représentation croisée des intensités des spots montrant la consistance des résultats du flip-dye : logarithme en base 2 des rapports de la condition « essai » marquée par Cy3 et de la condition « témoin » marquée par Cy5 en fonction du logarithme en base 2 des rapports de la condition « témoin » marquée par Cy3 et de la condition « essai » marquée par Cy5.

L'analyse de consistance des données du flip-dye (figure D) permet de vérifier sur un même graphique que la distribution des intensités des spots de la puce G120G1 et de celles de la puce G120G2 est homogène.



*Figure E: Représentation des intensités des spots conservés après analyse des niveaux d'expression des gènes effectuée à partir des données issus du flip-dye sur la base de l'exclusion des spots dont la valeur est comprise entre  $\pm 2\sigma$  de la valeur moyenne de la distribution des valeurs des spots (slice analysis). A gauche : représentation en logarithme base 2 des intensités. A droite : représentation du rapport des intensités en logarithme base 2 en fonction du produit des intensités en logarithme base 10.*

L'analyse finale basée sur l'exclusion par découpage des spots dont la valeur est comprise entre  $\pm 2\sigma$  de la valeur moyenne de la distribution des valeurs des spots permet de conserver 460 spots correspondant à des gènes exprimés de façon différentielle entre la condition témoin et la condition essai (figure E).

L'analyse des duplicats permet finalement, grâce au traitement détaillé au § 2.5.4.2. d'établir une liste d'une centaine de gènes significativement régulés.

