



AIX-MARSEILLE UNIVERSITÉ
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR 7265 CNRS CEA Aix-Marseille Université
CEA Cadarache

ARD
Agro-industrie Recherche et Développement

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur
Discipline : Microbiologie

**Exopolymère de *Ramlibacter tataouinensis* :
optimisation de sa production, caractérisation
biochimique et génétique**

Desislava JIVKOVA

Soutenue le 2 juillet 2018 devant le jury composé de :

Isabelle CAPRON (DR INRA, Nantes)	Rapporteur
Marie-Anne BARNY (DR INRA, Paris)	Rapporteur
Alain HEYRAUD (DR, CNRS, Grenoble)	Examineur
Nicolas ROCHE (Professeur AMU)	Examineur
Ghislain SANHAJI (Ingénieur, ARD, Pomacle)	Examineur
Thierry HEULIN (DR, CNRS, Cadarache)	Directeur de thèse

Remerciements

Avant de commencer la présentation de ce travail, j'ai le plaisir de remercier toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à son aboutissement.

Je voudrais tout d'abord remercier Thierry HEULIN pour m'avoir accueillie et de m'avoir encadrée durant ces années de thèse. Merci de m'avoir donné la possibilité d'effectuer ma thèse dans d'excellentes conditions et en collaboration avec des laboratoires mondialement reconnus. Merci encore pour vos décisions judicieuses qui nous menaient toujours vers les objectifs concrets de cette thèse en économisant du temps. Merci pour votre écoute et vos efforts pour terminer cette thèse. Votre travail n'était jamais facile compte tenu de la complexité de ce projet de thèse et de la présence de plusieurs collaborations. J'admire votre façon de rester calme et bienveillant face aux divers problèmes et conflits qui ont pu apparaître.

Un grand merci à ma co-directrice de thèse, Wafa ACHOUAK, qui a toujours eu des idées scientifiques très intéressantes qui m'ont aidée à faire avancer ce travail de thèse. Merci pour vos conseils sur l'ensemble de mes travaux, votre disponibilité et votre ouverture à la discussion.

Je remercie également Antony BRESIN de m'avoir accordé ce projet de thèse et d'avoir accepté qu'ARD le finance. Merci à Ghislain SANHAJI pour la bonne direction, l'aide, l'écoute, l'humanité, la gentillesse, les explications, la motivation, la résolution des problèmes, les blagues sympas et dernièrement de n'avoir pas effacé le superlabomen qui au final a bien réussi à gagner contre la bête de labo.

J'adresse également tous mes remerciements aux lecteurs attentifs de ce manuscrit, Isabelle CAPRON et Marie-Anne BARNY qui ont accepté d'être rapporteuses de ce travail, ainsi que Nicolas ROCHE, Alain HEYRAUD et Ghislain SANHAJI qui ont accepté d'examiner ce travail. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de pilotage de thèse qui m'ont fait bénéficier de leurs compétences et de leurs conseils avisés : Jean-Pierre SIMORRE (IBS, Grenoble), Antony BRESIN (ARD) Ghislain SANHAJI (ARD), Alain HEYRAUD et Wafa ACHOUAK.

Un grand merci à Catherine SANTAELLA pour son aide, sa disponibilité, ses réponses exhaustives à toutes mes questions suivies par des explications simples et compréhensibles. Merci encore pour sa gentillesse et son comportement très humain. Sa contribution a été particulièrement importante dans la caractérisation de l'EPS de Rta.

Un grand merci à Sylvain FOCESATO pour son aide et son encadrement dans les expériences de biologie moléculaire, pour son écoute, et pour le fait qu'il prenait mon travail comme son propre objectif de réussite, toujours avec l'espoir de voir la lumière verte au bout du tunnel.

Merci à Catherine BERTHOMIEU pour son aide et disponibilité pour les mesures spectroscopiques FTIR. Je remercie Mourad HARIR pour les innombrables analyses de MS qu'il a faites. Merci à Florian DELRUE pour son amitié et aide avec les analyses élémentaires. Merci à Catherine GARNIER pour m'avoir accueilli dans son laboratoire d'analyses rhéologiques. Je remercie Michel VIAUX pour sa bienveillance, sa serviabilité, ses explications et ses analyses lipidiques. Merci à Sophie LE GALL pour les bonnes explications sur la CPG.

Je tiens à remercier l'équipe d'ARD. Merci à Ghislain SANHAJI pour l'encadrement scientifique et technique de mon séjour à Pomacle et à Sylvaine CRAPART pour tous les conseils et ton amitié. Merci Denis MARRET pour ta disponibilité et tes explications très compréhensibles à mes questions sur les bioréacteurs, merci pour ton amitié. Merci Nicolas pour ta gentillesse. Merci à tous les techniciens Erel, Valérie, Brice, Damien, Katel et Annie du laboratoire « Fermentation » pour être une merveilleuse équipe toujours à disposition, j'étais vraiment heureuse de partager mes heures au laboratoire avec vous !

Je remercie Gilles DE LUCA pour ses explications exhaustives à chacune de mes questions, pour son envie simple et honnête de m'aider avec des conseils sur mes manip. Merci à Mohamed BARAKAT pour les moments passés sur le microscope en observant Rta, pour ses conseils et sa bienveillance.

Merci à Philippe ORTET, l'expert en informatique, qui réparait toujours les petits bugs du genre messagerie non fonctionnelle et encore pour les blagues assez drôles ! Merci à Astrid pour la super bonne humeur et le rayonnement au cours de mes premiers mois au LEMiRE. Merci à Nicolas pour son amitié et les moments de rire au labo. Merci à Mikael d'être le meilleur collègue de bureau tranquille et motivant pour le travail. Merci à Oulfat pour ses conseils bien réfléchis et son écoute. Merci à Marie BERTRAND pour sa disponibilité à trouver des objets divers dans le labo et pour l'aide avec les commandes.

Je remercie également les acteurs indirects de cette thèse qui me soutenaient pendant ces trois années. Merci Coralie pour les heures partagées de rédaction de thèse. Merci à mes collègues biologistes pour leur amitié et le partage du destin d'un thésard, merci Alena NOSOVA, Fred CHAUX, Monika LUNDANI, Margot tout court, Lin, Nicolas, Mohamed Hanchi, Christian, Van Dang, Laura, Inès, Evgeni. Merci Ludo pour les corrections sur mon manuscrit. Merci à Tim sans qui mes déplacements professionnels auraient été beaucoup plus compliqués. Merci Lilian pour ton soutien ! Merci Céphise pour ton aide avec le logiciel Adobe Illustrator. Merci Marie x 2, Thomas x 2, Louis, Jérôme, Christian, Anaïs pour votre amitié.

Table des matières

Abréviations

Table des illustrations

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Généralités sur les polysaccharides bactériens	4
1.1. Diversité des polysaccharides extracellulaires bactériens	4
1.2. Fonctions des EPS bactériens	5
1.3. Applications industrielles	6
2. Biosynthèse et localisation des EPS bactériens	10
2.1. Biosynthèse extracellulaire	10
2.2. Biosynthèse intracellulaire	11
2.2.1. Les transporteurs Wzx/Wzy	12
2.2.2. Les transporteurs ABC	13
2.2.3. Biosynthèse et transport dépendants d'une synthèse	16
2.3. Localisation de gènes de la synthèse d'EPS	17
3. Méthodes d'analyse de la structure des EPS	18
3.1. Analyse de la composition en monosaccharides	19
3.1.1. Hydrolyse de l'EPS	20
3.1.2. Méthodes de dosage colorimétriques des oses neutres et des acides uroniques ...	21
3.1.3. Analyse de la composition en monosaccharides par chromatographie	21
3.1.3.1. Méthodes de dérivation des oses pour l'analyse par CPG	21
3.1.3.2. Analyse par HPLC	23
3.2. Analyse structurale	27
3.2.1. Détermination de la nature des liaisons osidiques par méthylation	27
3.2.2. Analyse infrarouge	29
3.2.3. Analyse par RMN	29
3.2.4. Analyse par spectroscopie de masse	32
4. Propriétés rhéologiques des EPS	33
5. Optimisation des conditions de culture	35
5.1. Optimisation de la croissance bactérienne	35
5.1.1. Conditions physiques optimales	35
5.1.1.1. Température	35
5.1.1.2. pH	35
5.1.1.3. Effets osmotiques	36
5.1.1.4. Oxygénation	37
5.1.2. Milieu de culture optimal	37
5.1.2.1. Source de carbone	37
5.1.2.2. Source d'azote	37
5.1.2.3. Autres macronutriments	37
5.1.2.4. Micronutriments (éléments traces)	38
5.1.2.5. Facteurs de croissance	39
5.1.2.6. Milieu complexe et milieu défini	39
5.2. Optimisation de la production d'EPS	39

5.2.1.	Température	39
5.2.2.	pH.....	40
5.2.3.	Disponibilité en l'oxygène.....	40
5.2.4.	Source de carbone.....	40
5.2.5.	Source d'azote.....	40
5.2.6.	Autres nutriments.....	41
5.2.7.	Phase de croissance bactérienne	41
6.	Méthodes d'extraction/purification des EPS	41
6.1.	Extraction d'EPS.....	42
6.2.	Extraction d'EPS fermement attaché à la surface cellulaire	42
6.3.	Purification des EPS extraits	43
Chapitre 1 : Optimisation des conditions de culture pour la production d'EPS par <i>R. tataouinensis</i> TTB310		45
1.	Introduction.....	46
1.1.	Le cycle cellulaire de <i>R. tataouinensis</i> TTB310	46
1.2.	Production d'EPS par les kystes de <i>R. tataouinensis</i> TTB310.....	47
2.	Matériel et Méthodes	49
2.1.	Cultures de <i>Rta</i> en batch (tubes, Erlenmeyers)	49
2.1.1.	Milieux de culture.....	49
2.1.2.	Conditions de culture.....	51
2.1.3.	Dépôts de cultures liquides sur milieu solide.....	51
2.1.4.	Estimation de la masse de matière sèche	52
2.1.5.	Dénombrements bactériens et observations en microscopie.....	52
2.2.	Coloration de l'EPS au Calcofluor-white	52
2.3.	Culture de <i>Rta</i> en fed-batch (bioréacteurs).....	52
2.3.1.	Pré-culture.....	52
2.3.2.	Milieu de culture	53
2.3.3.	Conditions des cultures en fed-batch.....	54
2.3.4.	Suivi de la croissance	56
3.	Résultats	56
3.1.	Optimisation des conditions de culture de <i>Rta</i>	58
3.1.1.	Choix de la source de carbone pour la croissance de <i>Rta</i>	58
3.1.1.1.	Croissance de <i>Rta</i> dans le milieu TSB/10 (tubes à essai)	58
3.1.1.2.	Croissance de <i>Rta</i> dans le milieu TSB/10 + acétate.....	59
3.1.1.3.	Croissance de <i>Rta</i> dans le milieu TSB/10 + succinate.....	60
3.1.1.4.	Croissance de <i>Rta</i> dans le milieu TSB/10 + β -hydroxybutyrate.....	61
3.1.1.5.	Croissance de <i>Rta</i> dans le milieu TSB/10 + lactate.....	64
3.1.2.	Croissance bactérienne en présence des carbonates	66
3.1.3.	Croissance de <i>Rta</i> en fonction de la pression osmotique.....	68
3.1.3.1.	Effet du saccharose sur la croissance.....	69
3.1.3.2.	Tolérance à la force ionique	71
3.1.3.3.	Effet de la concentration de NaCl sur le ratio « kystes/bâtonnets »	74
3.1.4.	Croissance bactérienne en fonction de la concentration en caséine, peptone et d'extrait de levure	75
3.1.5.	Température optimale pour la croissance.....	77

3.2. Optimisation du milieu et production de polymère en fed-batch	77
3.2.1. Besoin en oxygène et optimum de pH.....	78
3.2.2. Croissance bactérienne en fonction de la quantité des composants organiques dans le milieu de culture, en ajustant le pH.....	83
3.2.3. Production du polymère en fed-batch	84
4. Conclusion	85
Chapitre 2 : Extraction, solubilisation et caractérisation de l'EPS de <i>R. tataouinensis</i> TTB310	87
1. Introduction.....	88
2. Matériels et Méthodes	89
2.1. Extraction de l'EPS à l'échelle préindustrielle.....	89
2.2. Analyse de la composition de l'EPS	91
2.2.1. Analyse élémentaire.....	91
2.2.1.1. Dosage de C, H, N et O	91
2.2.1.2. Dosage de chlore	91
2.2.2. Dosages colorimétriques.....	92
2.2.2.1. Monosaccharides totaux.....	92
2.2.2.2. Acides uroniques.....	92
2.2.3. Analyse HPLC de la composition et la quantité des lipides.....	92
2.2.3.1. Détection des lipides neutres	92
2.2.3.2. Fractionnement des lipides	92
2.2.4. Analyse CPG de la composition et la quantité en monosaccharides	93
2.2.5. Recherche de traces d'ARN	94
2.2.6. Spectrométrie de masse.....	94
2.2.7. Analyse par RMN	95
2.2.8. Analyse en spectroscopie FTIR.....	95
3. Résultats	95
3.1. Mise au point de l'extraction	95
3.2. Solubilisation de l'EPS.....	99
3.3. Caractérisation de l'EPS	100
3.3.1. Analyse élémentaire.....	101
3.3.2. Composition en monosaccharides et leur quantification (CPG et analyses colorimétriques)	103
3.3.2.1. Analyse en CPG en hydrolysant l'EPS de Rta par l'acide sulfurique	103
3.3.2.2. Analyse en CPG en hydrolysant l'EPS de Rta par méthanolyse	105
3.3.2.3. Quantification des ARN dans les échantillons d'EPS de Rta	108
3.3.3. Composition élémentaire par FTICR-MS.....	109
3.3.4. Structure de l'EPS par RMN.....	119
3.3.5. Analyse FTIR.....	128
3.4. Optimisation de la purification de l'EPS	130
3.4.1. Moyens de purification.....	130
3.4.1.1. Purification des échantillons d'EPS de Rta	130
3.4.2. Validation de la pureté	132
3.4.2.1. Analyse élémentaire et analyse colorimétrique des sucres totaux	132
3.4.2.2. FTIR.....	133

3.4.3. Solubilité d'EPS purifié.....	137
4. Conclusion.....	137
Chapitre 3 : Déterminants génétiques de la production de l'EPS de <i>R. tataouinensis</i> TTB310.....	139
1. Introduction.....	140
1.1. Choix et ciblage des clusters de gènes potentiellement responsables de la synthèse de l'EPS.....	140
1.2. Utilisation des mutants de Rta ne produisant plus d'hémoxigénase ou de bactériophytochrome 1.....	143
2. Matériels et Méthodes.....	144
2.1. Souches bactériennes et conditions de culture.....	144
2.2. Manipulation d'ADN.....	144
2.2.1. Extraction d'ADN de Rta.....	144
2.2.2. Extraction et purification de plasmides.....	145
2.2.3. Purification de fragments d'ADN.....	145
2.2.4. Séquençage d'ADN.....	145
2.2.5. Amplification par PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	145
2.3. Manipulation d'ARN.....	146
2.3.1. Extraction d'ARN totaux.....	146
2.3.2. Transcription inverse.....	147
2.4. Digestion enzymatique et ligation.....	147
2.5. Construction des vecteurs de fusions transcriptionnelles.....	148
2.6. Transformations.....	149
2.6.1. Cellules électro-compétentes.....	149
2.6.2. Transformation par électroporation des cellules électro-compétentes de Rta.....	149
2.6.3. Transformation des cellules chimio-compétentes d' <i>E.coli</i> par choc thermique	149
2.7. Microscopie de fluorescence.....	150
3. Résultats.....	150
3.1. Obtention des cultures enrichies en kystes ou en bâtonnets.....	150
3.2. Comparaison de la production d'EPS chez le mutant $\Delta RthmuO$ et la souche sauvage Rta.....	151
3.3. Validation de l'implication des gènes candidats dans la production d'EPS.....	152
3.3.1. Niveau d'expression des clusters de gènes candidats.....	153
3.3.2. Validation de l'expression du cluster ciblé chez <i>Rta</i>	156
4. Conclusions.....	158
BILAN ET PERSPECTIVES.....	159
RÉFÉRENCES.....	163
ANNEXES.....	182
Résumé.....	199
Abstract.....	199

Abréviations

-A-

ABC : ATP Binding Cassette
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AGU : Anhydroglucose
AL : Acide lactique
Ara : Arabinose
ARN : Acide RiboNucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate

-B, C-

BET : Bromure d'éthidium
CMP NeuAc : Cytidine-5'-MonoPhospho-
N-Acétyleuraminic acid
COLOC : COrrélation via LOng range
Coupling
COSY : COrrélation Spectroscopy
CP : Caséine Peptone
CPG : Chromatographie en Phase Gaseuse
CPS : Capsular Polysaccharide

-D-

D.O. : Densité Optique
DG : Diglycéride
DLN : Domaine qui lie les nucléotides
DMSO : Diméthyl sulfoxide
DOSY : Diffusion Ordered Spectroscopy
DTM : Domaine transmembranaire

-E-

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique
acid
EGTA : Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl
ether)-N,N,N',N'- acide tetraacetic acid
EPS : Exopolysaccharide

-F-

FID : Détecteur à ionisation de flamme
FTICR-MS : Fourier Transform Ion
Cyclotron Resonance Mass
Spectrometry
FTIR : Spectroscopie infrarouge à
transformée de Fourier

-G, H-, I-

Gal : Galactose
GHs : Glycosyl hydrolase
Glu : Glucose
GTP : Guanosine TriPhosphate
GTs : Glycosyl transférase
HETCOR : Heteronuclear correlation
HMBC : Heteronuclear Multiple-Bond
Correlation

HMQC : Heteronuclear Multi Quantum
Coherence
HSQC : Heteronuclear single-quantum
correlation spectroscopy
HPLC : Chromatographie en phase
liquide à haute performance
INADEQUATE : Incredible Natural-
Abundance Double-QUantum Transfer
Experiment

-M, N-

Man : Mannose
MG : MonoGlycéride
MS : Spectrométrie de masse
NDP-oses : Nucléoside-DiPhosphate fixé
aux monosaccharides
NOESY : Nuclear Overhauser Effect
spectroscopy
NTP : Nucléotide TriPhosphate

-P-

PCR : Réaction en chaîne par polymérase
PM : Poids moléculaire
pO₂ : Pression partielle en oxygène
PS : Polysaccharide

-R-

Rib : Ribose
Rha : Rhamnose
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY : Rotating frame nuclear Overhauser
effect spectroscopy
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR

-T-

TCA : TriChloroacetic acid
TFA : TriFluoroacetic Acid
TG : Triglycéride
TOCSY : Total Correlation Spectroscopy
TSB : Tryptic Soy Broth

-U-

UA : Uronic acid
UDP : Uracil diphosphate
UDP-ose : Uracil diphosphate fixé au
monosaccharide
UndPP : UndécaPrényl Phosphate
UTP : Uracil TriPhosphate

-X, Y-

Xyl : Xylose
YE : Yeast extract (extrait de levure)

Table des illustrations

FIGURES

Figure 1 : Schéma de la voie de synthèse et du transport des EPS, dépendante des transporteurs Wzx/Wzy.....	13
Figure 2 : Schéma de la voie de synthèse et transport des CPS, dépendante du système de transport ABC	15
Figure 3 : Schéma de la voie de synthèse et transport des EPS, synthase-dépendante	17
Figure 4 : Équilibre mutarotationnel du glucose	22
Figure 5 : Méthode de préparation des acétates d'alditol	23
Figure 6 : Étude de l'enchaînement de monosaccharides par méthylation et une analyse par CPG	28
Figure 7: Nomenclature systématique pour les fragmentations d'oligosaccharides générés par MS en tandem.....	32
Figure 8 : Structuration de la phase aqueuse en présence de polysaccharide	34
Figure 9 : Schéma du cycle cellulaire de <i>Ramlibacter tataouinensis</i>	47
Figure 10 : Production d'EPS que par les kystes, observée par microscopie optique et microscopie en fluorescence des colonies de Rta marquées au Calcofluor-white.....	48
Figure 11 : Image plus détaillée de la fluorescence d'EPS réalisée par l'observation d'une colonie de Rta en microscopie optique et microscopie en fluorescence	49
Figure 12 : Etapes de pré-cultures pour l'inoculation des bioréacteurs.....	53
Figure 13 : Schéma des bioréacteurs utilisés	55
Figure 14 : Estimation de la croissance de Rta dans le milieu TSB/10	59
Figure 15 : Estimation de la croissance de Rta en présence de l'acétate.....	60
Figure 16 : Estimation de la croissance de Rta en présence de succinate.....	61
Figure 17 : Estimation de la croissance de Rta en présence de β -hydroxybutyrate	63
Figure 18 : Différenciation de couleur des kystes et des bâtonnets.....	63
Figure 19 : Estimation de la croissance de Rta en présence de lactate	64
Figure 20 : Corrélation entre la masse de matière sèche moyenne et la mesure de D.O. pour estimer la croissance de Rta dans deux conditions de culture : milieu TSB/10 avec ou sans de lactate 10 mM	65
Figure 21 : Effet de CaCO_3 sur la croissance bactérienne dans milieu TSB/10 en présence de 10, 20 et 40 mM de succinate par comptage des cfu/mL.	67
Figure 22 : Effet de 5 mM CaCO_3 sur la croissance bactérienne.....	67
Figure 23 : Effet de NaHCO_3 (5, 10 et 15 mM) et CaCO_3 (5 mM) sur la croissance bactérienne.....	68
Figure 24 : Estimation de la croissance de Rta en présence de saccharose : A) dans le milieu TSB/10 supplémenté avec 2 et 5 g/L saccharose	70

Figure 25 : Croissance de Rta en réponse à des concentrations croissantes en NaCl	72
Figure 26 : Croissance de Rta en réponse à NaCl.....	73
Figure 27 : Tolérance de Rta aux différentes concentrations en KCl	73
Figure 28 : Croissance de Rta dans un milieu TSB/10 ajusté à différentes valeurs du pH	74
Figure 29 : Taux d'enkystement de Rta dans TSB/10 + 10 mM lactate au cinquième jour de culture, en présence ou non de NaCl 0,4 %	75
Figure 30 : Dénombrement bactérien de Rta développé dans milieu TSB/10 modifié	76
Figure 31 : Croissance de Rta dans milieu de culture TSB/10 modifié par remplacement de l'extrait de soja par extrait de levure.....	76
Figure 32 : Comparaison de la croissance de Rta à 25 et 30 °C.....	77
Figure 33 : Première expérience de développement de Rta en milieu de culture TSB/10 supplémenté du lactate 10 mM dans un bioréacteur	79
Figure 34 : Croissance de Rta pendant la première expérience en bioréacteur dans milieu TSB/10 supplémenté du lactate 10 mM.....	80
Figure 35 : Évolution du pH, de la pO ₂ , de la température, de l'agitation et de l'addition d'acide lactique (AL 10%) lors de la deuxième expérience de développement de Rta dans un milieu de culture TSB/10 + de lactate 10 mM dans un bioréacteur	81
Figure 36 : Consommation de l'acide lactique suivi en HPLC lors de la deuxième expérience de développement de Rta dans un milieu de culture TSB/10 + de lactate 10 mM dans un bioréacteur.....	82
Figure 37 : Croissance de Rta estimée par la mesure de la D.O. à 600 nm lors de la deuxième expérience de développement de Rta dans un milieu de culture TSB/10 + de lactate 10 mM dans un bioréacteur.....	82
Figure 38 : Croissance de Rta (D.O. à 600 nm) dans un bioréacteur avec un milieu composé de tryptone 1 g/L, extrait de levure 0,3 g/L, K ₂ HPO ₄ 0,25 g/L, NaCl 0,5 g/L et 10 mM de lactate.....	83
Figure 39 : Croissance de Rta (D.O. à 600 nm) dans un bioréacteur avec un milieu composé de tryptone 4 g/L, extrait de levure 1,3 g/L, K ₂ HPO ₄ 0,25 g/L, NaCl 0,5 g/L et 10 mM de lactate.....	84
Figure 40 : Kystes de Rta en division, observés en microscopie électronique à transmission.....	96
Figure 41 : Décollement de l'EPS de la surface des cellules de Rta après leur suspension dans PBS modifié et traitement au 4% TCA.....	98
Figure 42 : Protocole d'extraction de l'EPS de Rta	99
Figure 43 : Composition élémentaire massique en C, H, O, N et Cl de l'EPS de Rta	102
Figure 44 : Composition élémentaire massique en C, H et O de l'EPS de Rta après la soustraction du TCA	102
Figure 45 : Profil chromatographique (CPG) de la composition osidique de l'unité répétée de l'EPS de Rta, prétraité par une hydrolyse à l'acide sulfurique 13 M et puis traité à l'acide sulfurique 1 M, 2 h, 100 °C.	104

Figure 46 : Pourcentage massique de glucose, galactose, arabinose, xylose, mannose dans les échantillons d'EPS de Rta issus de trois cultures bactériennes indépendantes en fed-batch.....	105
Figure 47 : Profils chromatographiques en CPG de l'EPS de Rta hydrolysé par une méthanolyse	107
Figure 48 : Pourcentage massique de glucose, galactose, ribose, mannose et pourcentage massique total en monosaccharides présents dans l'échantillon d'EPS de Rta selon l'analyse CPG	108
Figure 49 : Spectre d'absorbance de l'EPS de Rta mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoVue).....	109
Figure 50 : Gel d'électrophorèse pour la détection d'ARN ribosomique dans l'EPS de Rta.	110
Figure 51: Fragmentation d'un ion $[M+Na]^+$	111
Figure 52 : Sélection des carbohydrates dans les échantillons d'EPS de Rta parmi les masses obtenus en FTICR-MS.....	113
Figure 53 : Utilisation d'une matrice de distance entre m/z pour rechercher des pertes de masses caractéristiques de mono- et oligosaccharides.....	117
Figure 54: Exemple d'interprétation des m/z et des pertes de masse entre m/z. pour un oligosaccharide de type 'pentose-pentose-hexose"	118
Figure 55: Spectre schématique HSQC montrant les gammes de déplacements chimiques typiques des signaux RMN des protons et des carbones dans les carbohydrates	121
Figure 56 : Zoom sur la zone des protons anomères.....	124
Figure 57: Spectre proche infrarouge (FTIR) de l'EPS de Rta.....	130
Figure 58: Modification du protocole d'extraction de l'EPS de Rta pour obtenir des échantillons purifiés.....	132
Figure 59: Taux de monosaccharides réducteurs dans les échantillons d'EPS purifiés	133
Figure 60: Composition élémentaire, analysé en triplicats pour C, H et N, de l'EPS de Rta, extrait selon le protocole modifié	134
Figure 61: Spectre proche infrarouge (FTIR) d'EPS de Rta purifié.....	136
Figure 62: Disposition et description du cluster 1 de gènes potentiellement responsables de la synthèse d'EPS chez Rta	141
Figure 63: Disposition et description du cluster 2 de gènes ciblés comme potentiellement responsables pour la synthèse d'EPS chez Rta.....	142
Figure 64: Construction des fusions transcriptionnelles pour quantifier l'expression du cluster 2 de gènes cibles potentiellement impliqués dans la production d'EPS chez Rta..	149
Figure 65: Comparaison de la taille des kystes dans des agrégats de kystes.....	151
Figure 66: Production d'EPS par les kystes de Rta wt et son mutant $\Delta RtHmuO$	152
Figure 67: Quantification d'ARN extrait avec de TRIzol ou de kit RNa protect par RT-PCR des ARNr 16S des cultures de $\Delta RtHmuO$ et $\Delta RtBphP1$	153

Figure 68 : Expression des gènes Rta_08680, Rta_08740, Rta_08780 et Rta_08810 (cluster 1) chez les mutants $\Delta RtHmuO$ (enrichissement en kystes) et $\Delta RtBphP1$ (enrichissement en bâtonnets)	154
Figure 69 : Quantification d'ARN extrait avec du TRIzol ou avec le kit RNAProtect par RT-PCR des ARNr 16S des cultures de $\Delta RtHmuO$ et de $\Delta RtBphP1$	155
Figure 70: Expression des gènes Rta_10900, Rta_10880, Rta_10870 et Rta_10830 chez les mutants $\Delta RtHmuO$ et $\Delta RtBphP1$	156
Figure 71: Image en microscopie optique et son image correspondante en microscopie de fluorescence sur le bord d'une colonie de la souche Rta wt transformée avec la fusion transcriptionnelle de la région en « amont » de Rta_10900, contenant le promoteur du cluster responsable pour la synthèse d'EPS	157
Figure 72: Image en microscopie optique et son image correspondant en microscopie de fluorescence sur le bord d'une colonie de Rta wt transformée avec la fusion transcriptionnelle de la région en « amont » de Rta_10900, contenant le promoteur du cluster 2 responsable pour la synthèse d'EPS et le gène egfp, insérés au sein du vecteur pBBR1MCS-2	157
Figure 73 : Raccourcissement des bâtonnets de Rta due à l'effet de la pression osmotique, en présence de 0,3 % NaCl	182
Figure 74 : Effet de la pression osmotique, causée par des concentrations variables en KCl, sur la forme de Rta	183
Figure 75 : Enkystement de Rta sur milieu gélosé en présence de NaCl	184
Figure 76 : Enrobage commun de plusieurs kystes dans des gros agrégats de kystes ..	184
Figure 77 : Taux d'enkystement de Rta pendant le quatrième et le cinquième jour de culture, influencé par la présence de NaCl	185
Figure 78 : Effet de l'ajout de solution minérale et d'éléments traces dans le milieu de culture, composé de tryptone 4 g/L, extrait de levure 1,3 g/L, 10 mM lactate, sur le développement de Rta	187
Figure 79 : Identification par HPLC de la présence des lipides neutres dans l'échantillon d'EPS de Rta	188
Figure 80 : Profils HPLC des extraits lipidiques totaux des échantillons d'EPS de Rta ..	189
Figure 81 : Profil HPLC de fraction $CHCl_3$ éluant les lipides neutres, acétone éluant les glycolipides et méthanol éluant les phospholipides sur une extraction sur phase solide.	190
Figure 82 : Spectre 1H RMN de l'EPS de Rta dans D_2O (800 MHz, 310 K) et taux des sous-structures principales	193
Figure 83 : Spectre RMN 1H , 1H TOCSY (temps de mélange = 70 msec) représentant la section aliphatique de l'EPS de Rta dans D_2O (800 MHz, 310 K)	193
Figure 84 : Spectre RMN 1H , 1H TOCSY (temps de mélange = 70 msec) représentant la section saccharide de l'EPS de Rta dans (800 MHz, 310 K)	195
Figure 85 : Spectre RMN 1H , 1H TOCSY (temps de mélange = 70 msec ; 800 MHz, 310 K) représentant une molécule aliphatique spécifique, possiblement un polymère contenant de l'azote	193

Figure 86 : Spectre RMN ^1H , ^{13}C DEPT-HSQC (sélectif pour CH_2 : les carbones de méthylène et méthine présentent ; 800 MHz, 310 K).	197
Figure 87 : Spectre ^1H RMN de l'EPS de Rta dans un mélange D_2O / DMSO-d_6	193

TABLEAUX

Tableau 1 : Fonctions biologiques des EPS bactériens	5
Tableau 2 : Les EPS bactériens produits industriellement : monomères constitutants, charge, propriétés, applications et bactéries productrices. (Patel et Prajapati, 2013 ; Freitas <i>et al.</i> , 2011)	8
Tableau 3 : Taux des différents composants dans les exopolymères bactériens qui varient selon les espèces bactériennes (d'après Flemming et Wingender, 2001b)	18
Tableau 4 : Liste des constituants des EPS bactériens.....	19
Tableau 5 : Méthodes de dérivation des monosaccharides	22
Tableau 6 : Différentes configurations d'HPLC utilisées pour la détection de mélanges de monosaccharides (Goeij et Kok, 2013)	25
Tableau 7 : Liste des corrélations RMN utilisées dans l'étude de la structure des EPS	31
Tableau 8 : Rôle des macronutriments (autres que C et N) dans le métabolisme bactérien (VanDemark et Batzing, 1987)	38
Tableau 9 : Micronutriments nécessaires à la structure de protéines (VanDemark et Batzing, 1987).....	38
Tableau 10: Comparaison de la composition élémentaire massique en C, H, O de l'EPS de Rta avec certains exemples de monosaccharides substitués ou pas, des oligosaccharides, ainsi que de deux acides gras. La contribution en C, H et O de la contamination de l'échantillon avec le TCA a été soustraite pour le calcul de ces pourcentages.	102
Tableau 11: Recherche de structures potentielles correspondant au pic $m/z = 293.0877$	115
Tableau 12 : Ions caractéristiques de monosaccharides. Pour faciliter la lecture, les masses ont été arrondies à l'unité.	116
Tableau 13 : Pertes de masse correspondant à des fragmentations de monosaccharides	116
Tableau 14 : Attribution de structures potentielles correspondant aux m/z et aux pertes de masse entre signaux. UA symbolise un acide uronique.....	119
Tableau 15 : Résumé des structures potentielles et nombre de fragments indicateurs de ces structures :	120
Tableau 16 : Déplacements chimiques (d) des protons et carbones anomériques d'après la séquence HSQC.	125
Tableau 17: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide A	126
Tableau 18: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide B. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé.....	126
Tableau 19: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide C. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé.....	127

Tableau 20: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide E. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé..... 127

Tableau 21: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide H. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé..... 128

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le marché mondial des hydrocolloïdes est dominé par les polysaccharides provenant des plantes et des algues, comme l'amidon, le galactomannane, la pectine, le carraghénane et l'alginate (Freitas *et al.*, 2011). Le fait que ces polysaccharides nécessitent souvent une modification chimique ou enzymatique pour améliorer leurs propriétés rhéologiques, n'empêche pas qu'ils soient les plus produits à l'échelle mondiale (Patel et Prajapati, 2013). Ainsi les exopolysaccharides (EPS) d'origine microbienne sont toujours en compétition dans leurs applications avec d'autres polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les EPS bactériens doivent posséder des propriétés avantageuses par rapport aux autres polysaccharides pour être afin commercialisés. Par exemple le coût de production est économiquement acceptable si les EPS bactériens sont utilisés comme molécules de haute qualité et à haute valeur ajoutée et, c'est le cas en cosmétologie ou en pharmacie. Ainsi historiquement l'entreprise A.R.D. (Agro-industrie Recherche et Développement), qui finance ce projet de thèse via une convention CIFRE, et le laboratoire partenaire LEMiRE (UMR 7265 CNRS-CEA-Aix-Marseille Univ.) ont réalisé la commercialisation de deux EPS bactériens avec une haute valeur cosmétologique. Le premier EPS, synthétisé par la souche *Rhizobium alarii* YAS34 et appelé commercialement « Soligel », est utilisé à la fois en cosmétologie et comme base de milieu nutritif en microbiologie. Le deuxième EPS, produit par *Burkholderia caribensis* MWAP71, commercialisé sous le nom de « Hydreïs » (Crapart *et al.*, 2012) permet la réparation de la barrière cutanée ainsi que l'hydratation de la peau. La recherche de nouveaux polysaccharides bactériens revêt un intérêt industriel important pour des applications en cosmétologie mais également dans l'agroalimentaire et l'agronomie. La très grande diversité des bactéries du sol s'accompagne d'une très grande diversité d'exopolymères bactériens (Hebbar *et al.*, 1992) ayant des propriétés originales pour des applications industrielles (Brésin *et al.*, 2008).

Notre attention a été attirée par la souche bactérienne *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (Rta) et sa capacité à s'enkyster en produisant un EPS. Cette souche a été isolée à partir du sable enrobant un fragment d'une météorite, 63 ans après sa chute près de la ville de Tataouine en Tunisie. Des observations en microscopie électronique à balayage de nombreux fragments de météorite érodés, ont révélé la présence de cristaux secondaires de calcite provenant de l'érosion terrestre témoignant la présence possible de formes bactériennes de petite taille ($\varnothing$ 0,06 μm). En comparaison, aucune altération n'était visible sur les échantillons témoins de fragments de météorite (conservés au Muséum) (Barrat *et al.*, 1998). Afin de rechercher une bactérie responsable de cette altération, la souche bactérienne pléiomorphe (TTB310), présente sur ces fragments de météorite enrobés de sable, sous la forme "bâtonnet" ayant un diamètre compris entre 0,1 et 0,2 μm , a été isolée (Gillet *et al.*, 2000). Cette souche est la souche-type d'une nouvelle espèce, *Ramlibacter tataouinensis*, elle-même espèce-type d'un nouveau genre bactérien, *Ramlibacter* (Heulin *et al.*, 2003). Le génome de la souche TTB310 a été séquencé et exploré par une annotation experte (De Luca *et al.*, 2011)

C'est une bactérie à croissance lente (temps de génération d'environ 3 h en milieu TSB/10) qui est capable de résister à la dessiccation. En effet elle existe sous deux formes : kystes et bâtonnets sont capables de se diviser indépendamment. Les kystes représentent la forme qui tolère la dessiccation grâce à la production d'un EPS

(Benzerara *et al.*, 2004 ; Gommeaux *et al.*, 2005 ; De Luca *et al.*, 2011) alors que les bâtonnets qui n'en produisent pas sont très sensibles à la dessiccation.. L'hypothèse sous-jacente à ce travail de thèse est que cet EPS pourrait avoir une composition et une structure originale et donc des propriétés particulièrement intéressantes pour la rétention d'eau chez les kystes, leur évitant la perte d'eau pendant les phases de dessiccation. Nous avons par ailleurs démontré que cette bactérie ne dispose pas de système de réparation de dommages massifs à l'ADN, contrairement à des bactéries appartenant au genre *Deinococcus* (Heulin, communication personnelle).

Les travaux de recherche se sont déroulés en trois étapes : la première représente un verrou majeur car elle vise à optimiser les conditions de culture pour une meilleure production de l'EPS ainsi que son extraction; la deuxième étape concerne la caractérisation biochimique de l'EPS et enfin la troisième et dernière étape vise à trouver les déterminants génétiques responsables de la synthèse de l'EPS.

Les travaux d'optimisation la production de biomasse et d'EPS ont été réalisés à l'échelle du tube à essai ou de l'ermeneyer au sein de laboratoire LEMiRE et à l'échelle préindustrielle au sein de l'entreprise ARD. Les impacts de la pression osmotique, du pH, de l'oxygénation, de la concentration en éléments nutritifs sur la production de biomasse et d'EPS ont été étudiés afin d'obtenir une culture dense et enrichie en agrégats de kystes. Tous les protocoles d'extraction d'EPS de Rta et les étapes de purification proposés ont été développés au sein de laboratoire LEMiRE. La caractérisation partielle d'EPS a été réalisée en partenariat ou en sous-traitance avec plusieurs laboratoires. Les analyses élémentaires ont été réalisées par le Service "Instrumentation" à l'Institut des Sciences Analytiques (ISA-CNRS) et en collaboration avec la plateforme Bioénergie de la Cité des énergies (DRT, CEA Cadarache). Les analyses en CPG ont été faites au CERMAV (CNRS, Grenoble) et sur la plateforme BIBS de l'unité BIA (INRA, Nantes). Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par le Dr. Mourad HARIR (Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Allemagne) et interprétées avec l'aide de Catherine SANTAELLA. Les spectres IR ont été produits par Dr. Catherine Berthomieu (LIPM, CEA Cadarache). Les études sur la solubilisation de l'EPS de Rta ont été effectuées grâce aux conseils de Catherine GARNIER dans le laboratoire BIA (INRA, Nantes). Enfin les travaux sur les déterminants génétiques responsables de la synthèse d'EPS ont été effectués au sein de laboratoire LEMiRE avec l'aide de Sylvain FOCESATO.

L'ensemble des travaux réalisés constitue la première optimisation décrite du milieu de culture de Rta, la première caractérisation de la structure d'EPS de Rta, ainsi que la première identification du cluster de gènes responsables pour la synthèse de cet EPS.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les polysaccharides bactériens

Comme tous les organismes vivants, les bactéries produisent des polysaccharides (PS) essentiels à leur croissance et leur reproduction. Ces polysaccharides peuvent être divisés en trois catégories principales : (i) les PS intracellulaires dont la fonction majeure est le stockage du carbone et de l'énergie dans la cellule ; (ii) les PS structuraux donnent la structure physique de la paroi bactérienne ; et (iii) les PS extracellulaires qui sont sécrétés ou synthétisés à l'extérieur de la cellule. Ce trait phénotypique consistant à produire des exopolymères et plus particulièrement des exopolysaccharides (EPS) est polyphylétique puisqu'il se retrouve dans la plupart des phylums bactériens et qu'il est associé à la capacité des bactéries à s'adapter à des conditions environnementales très diversifiées (Nwodo *et al.*, 2012 ; Kumar *et al.*, 2007). Dans la suite de cette introduction générale et de la présentation des résultats, nous restreindrons notre propos aux exopolysaccharides bactériens, tout en sachant que ces EPS peuvent être associés à des protéines, des lipides et des acides nucléiques (Flemming et Wingender, 2001).

1.1. Diversité des polysaccharides extracellulaires bactériens

Les polysaccharides extracellulaires bactériens sont produits généralement sous deux formes et leur distinction se fait selon le degré d'association avec la surface cellulaire de la bactérie productrice. La première forme est fortement fixée de façon covalente soit aux phospholipides, soit aux molécules de lipide-A et constitue une capsule (CPS, Capsular PolySaccharide) (Whitfield et Valvano, 1993). La deuxième forme représente une structure moins fixée à la surface bactérienne nommée exopolysaccharide (EPS, ExoPolySaccharide). La plupart des bactéries montrent une préférence dans la production de l'un ou de l'autre type de polysaccharides extracellulaires (Vanhooren et Vandamme, 1998). Certaines bactéries appartenant aux genres *Rhizobium*, *Agrobacterium* et *Alcaligenes* peuvent produire plusieurs EPS de nature biochimique différente (Sutherland, 1985).

Cependant le critère de la différenciation entre CPS et EPS (liaison du polymère sur la surface bactérienne), doit être utilisé avec précaution. En effet les CPS peuvent également être libérés dans le milieu de culture en relation avec la stabilité de la liaison phosphodiester entre le polymère et la base phospholipidique (Goncalves *et al.*, 2014 ; García-Ochoa *et al.*, 2000). De plus, si la bactérie produit de grandes quantités de CPS, le polymère peut donner l'impression d'être détaché (Whitfield, 1988). De la même façon, certains EPS peuvent être confondus avec des CPS en restant étroitement associées avec la surface cellulaire (Troy *et al.*, 1971). La distinction est encore plus difficile dans certains cas, avec la description de phénomènes de mutation se traduisant par une transition de CPS en EPS détaché (Whitfield, 1988). Une définition intéressante et plus détaillée a été donnée par Costerton *et al.* (1981) qui distinguent quatre types de capsules : (i) rigides qui excluent des particules comme l'India ink ; (ii) flexibles car suffisamment déformables et qui n'excluent pas des particules de marquage ; (iii) intégrales, étroitement attachées à la surface cellulaire ; et (iv) périphériques qui peuvent être associées à la cellule ou excrétées dans le milieu. Le débat sur cette classification est encore actuel et, selon les auteurs, les EPS peuvent être définis comme correspondant au type (ii) s'ils sont concentrés sur la surface cellulaire et au type (iv) s'ils sont détachés.

1.2. Fonctions des EPS bactériens

Les bactéries produisant des EPS sont retrouvées dans de nombreuses niches écologiques. Les EPS influencent la manière dont les bactéries interagissent avec le milieu extérieur, qu'il soit liquide ou solide. Ces EPS ont de nombreux rôles physiologiques dépendants de l'environnement naturel spécifique de l'organisme. Il a été suggéré que la capacité à produire des EPS était une réponse adaptative à la pression de sélection exercée par le milieu naturel. La plupart de ces fonctions interviennent dans la protection des bactéries vis-à-vis du milieu extérieur (Dudman, 1977). Quelques fonctions des EPS sont décrites dans le Tableau 1 :

Tableau 1 : Fonctions biologiques des EPS bactériens

Processus	Pertinence fonctionnelle	Ref.
Adhésion	EPS intervenant dans les premières étapes de la colonisation d'une surface (abiotique ou biotique) et dans l'attachement sur long terme sous forme de biofilms	(Geesey et White, 1990)
Agrégation cellulaire des bactéries	EPS permettant un pontage entre les cellules, de cette façon immobilisant temporairement une population bactérienne, reconnaissance cellule-cellule	(Anwar <i>et al.</i> , 1985 ; Garnett et Matthews, 2012)
Rétention d'eau	EPS : molécules hydrophiles ayant une grande capacité en rétention d'eau. Ainsi ils maintiennent un microenvironnement hydraté autour de la cellule, l'agrégat des cellules ou le biofilm permettant la survie en situation de dessiccation	(Low <i>et al.</i> , 1998)
Cohésion des biofilms	EPS neutres et chargés formant un réseau hydraté du polymère (la matrice du biofilm), donnant une stabilité mécanique des biofilms (souvent en conjonction avec des cations polyvalents), et déterminant l'architecture du biofilm et la communication cellulaire	(Allison <i>et al.</i> , 1998)
Source nutritive	EPS peuvent servir de source de carbone, N et P pour les bactéries (ex. dextrane)	(Nwodo <i>et al.</i> , 2012)
Barrière protectrice	EPS permettant une protection vis-à-vis de la prédation, protégeant certaines enzymes (<i>e.g.</i> nitrogénase, hydrogénase...) sensibles à l'O ₂ , et conférant une résistance aux défenses spécifiques et non-spécifiques de l'hôte lors d'une infection	(Dudman, 1977 ; Jann et Jann, 1983 ; Costerton <i>et al.</i> , 1987 ; Gilbert et Foley, 1997)
Implication dans des relations symbiotiques	Les lectines à la surface des racines de plantes peuvent être importantes dans l'établissement des associations symbiotiques en se liant aux EPS de <i>Rhizobium</i> et ainsi participer aux interactions légumineuses- <i>Rhizobium</i>	(Sherwood <i>et al.</i> , 1984)
Sorption des composés organiques et ions inorganiques	Les EPS chargés et hydrophobes ont une fonction d'accumulation de nutriments faisant partie de la stratégie générale pour survivre en conditions oligotrophes. Ils favorisent les échanges ioniques contribuant à la détoxification environnementale; importance pour la corrosion des surfaces métalliques	(Wolfaardt <i>et al.</i> , 1998; Decho, 2000; Dudman, 1977)
Liaison des enzymes	Rétention, stabilisation et accumulation des enzymes à la surface des bactéries	(Stephnaya <i>et al.</i> , 2001)

Export des composants cellulaires	Les lipopolysaccharides (les lipides isoprénoïdes portant un glycosyl) sont des lipo-glyco conjuguants, impliqués dans la sortie des matériaux cellulaires résultant de cycle métabolique	(Nwodo <i>et al.</i> , 2012)
Stockage d'énergie	Les EPS peuvent stocker un excès de carbone lors la croissance en conditions de ratios C/N trop élevés	(Philippis <i>et al.</i> , 1996)
Cryo-protection	La quantité de l'EPS produit peut augmenter avec la diminution de la température. Ce phénomène est un caractère d'adaptation important pour les bactéries vivant dans les environnements très froids	(Nichols <i>et al.</i> , 2005b; Junge <i>et al.</i> , 2004)
Protection de la salinité élevée	Les EPS servent comme barrière de diffusion entre la paroi cellulaire et les environnements hypersalins	(Nichols <i>et al.</i> , 2005b)

1.3. Applications industrielles

Les EPS représentent un grand intérêt industriel qui est lié à leurs propriétés structurales et fonctionnelles très diversifiées. Une fonction importante est la capacité des EPS à modifier le milieu aqueux par épaississement, émulsification, chélation, stabilisation, suspension, formation de gels, mais aussi à encapsuler ou flocculer des particules dispersées. Les EPS sont utilisés pour stabiliser les émulsions et les suspensions et ainsi donner la structure physique requise pour l'emballage de produits et leur distribution. Ils trouvent une large utilisation dans le domaine agro-alimentaire pour leurs qualités épaississantes et gélifiantes qui peuvent améliorer ou standardiser certains produits alimentaires. Les EPS sont souvent utilisés pour éliminer les défauts indésirables liés à la perte d'eau (synérèse) de certains aliments transformés, et comme agents "gonflants" dans la formulation de produits à faible teneur en calories. Les EPS trouvent aussi des applications dans les traitements d'eau, les céramiques, les vernis, les explosifs, les peintures, la récupération des hydrocarbures, le traitement dans l'industrie minière et minérale, les adhésifs, les détergents, la pharmacutique, la cosmétologie, ainsi que comme matrice pour la séparation moléculaire ou comme additif dans les milieux de culture (Lapasin et Pricl, 1999).

Le plus grand inconvénient des EPS bactériens est leur coût de production élevé dû à l'utilisation de substrats et de processus d'extraction et de purification coûteux. Pour diminuer les coûts de production les substrats traditionnels pour les milieux de culture (glucose, fructose, saccharose, etc.) peuvent être remplacés par des sources de carbone à faible coût comme les résidus ou les effluents de l'industrie agro-alimentaire (Kumar *et al.*, 2007). Certains EPS bactériens, malgré leur coût de production, sont commercialisés en raison de leurs propriétés originales. Par exemple les EPS bactériens peuvent avoir un intérêt pour la santé du consommateur. C'est le cas du dextrane produit par *Leuconostoc spp.* et utilisé pour réduire la viscosité du sang comme agent antithrombotique (Lapasin et Pricl, 1999). Une autre stratégie pour procurer à un EPS une valeur ajoutée supplémentaire consiste à modifier sa structure par voie chimique. Ainsi, le produit peut trouver une nouvelle niche d'application : cas de Sephadex® utilisé en chromatographie de filtration sur gel et qui est un dérivé du dextrane. Pour valoriser les EPS bactériens, il est également important de mettre en avant leurs nombreux avantages. Les EPS peuvent être biocompatibles, biodégradables, bioadhésifs et non-toxiques. Ces polymères biosynthétisés sont homogènes et purifiables. Par exemple, dans le cas de la cellulose bactérienne, produite par *Acetobacter xylinum*, ces

caractéristiques lui permettent de remplacer avec succès la cellulose végétale pour certaines applications (membranes acoustiques de grande fermeté). Un autre atout des EPS est qu'ils proviennent de bactéries qui occupent plusieurs niches écologiques et ainsi possèdent une grande diversité structurelle et fonctionnelle, ayant potentiellement une large gamme d'applications industrielles. Enfin les monosaccharides les plus répandus dans les EPS sont le glucose et le galactose, sachant que de nombreux EPS peuvent contenir des monosaccharides plus rares comme le fucose (Vanhooren et Vandamme, 1999).

Finalement peu d'EPS bactériens sont exploités commercialement et produits à grande échelle. Les plus utilisés sont les suivants : xanthane, gellane, curdlane et succinoglycane (Freitas *et al.*, 2011). Le xanthane est le plus produit industriellement en raison de son taux élevé de transformation du substrat en EPS (40-60 %). Les autres EPS bactériens utilisés industriellement sont : l'alginate, la cellulose, le dextran, le lévane et le hyaluronane. La composition, les propriétés, les applications ainsi que les bactéries productrices des EPS les plus connues sont décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Les EPS bactériens produits industriellement : monomères constitutants, charge, propriétés, applications et bactéries productrices. (Patel et Prajapati, 2013 ; Freitas *et al.*, 2011)

	EPS	Monomères	Charge	Propriétés	Applications	Bactérie productrice	Ref.
Homopolysaccharides	Cellulose	β-D-glucose	Neutre	Haut taux de cristallinité, insoluble dans la plupart des solvants, résistance à la traction, mouillabilité	En médecine comme une peau artificielle et temporaire afin de guérir les brûlures ou les plaies chirurgicales. Dans la nutrition comme fibre non digestible naturelle qui peut être imprégné avec des acides aminés, des vitamines et des minéraux. Dans la technologie de séparation, comme une membrane acoustique dans l'équipement audio-visuel.	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Agrobacterium</i>	(Ross <i>et al.</i> , 1991)
	Curdlane			Capacité gélifiante, insoluble dans l'eau, comestible et non-toxique, activité biologique	Comme agent gélifiant, matrices immobilisées. Avec zidovudin (AZT) : activité antirétrovirale prometteuse (médicament contre VIH)	<i>Agrobacterium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>	(Cui et Qiu, 2012)
	Dextrane	α-D-glucose	Neutre	Non-ionique, stable, comportement d'un fluide newtonien	Dans les produits de confiserie pour améliorer la rétention de l'eau, la viscosité et l'inhibition de la cristallisation des monosaccharides. En médecine vétérinaire et humaine : comme agent améliorant le flux sanguin et comme agent diminuant le cholestérol. Dans les technologies de séparation de systèmes avec deux phases aqueuses. Comme des micro-transporteurs dans des cultures cellulaire/tissulaires.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc dextranicum</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	(Petel et Prajapati, 2013 ; Freitas <i>et al.</i> , 2011)
	Lévane	β-D-fructose	Neutre	faible viscosité, solubilité important dans l'eau, activité biologique, activité anti-tumeur, anti-inflammatoire, force adhésive, capacité à former des films	Dans les produits de confiserie, dans les glaces comme agent viscosifiant et stabilisant. Dans les produits pour la soin des cheveux. Pour la production des nanocomposites. Plusieurs applications en médecine.	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Rahnella aquatilis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Zymomonas sp.</i>	(Srikanth <i>et al.</i> , 2015)

	EPS	Monomères	Charge	Propriétés	Applications	Bactérie productrice	Ref.
Hétéropolysaccharide	Alginate	acide mannuronique et galuronique	Anionique	Hydrocolloïde, capacité gélifiante, formation des films	Matrice d'immobilisation pour des cellules viables et des enzymes, revêtement des racines de plantules et de plantes pour empêcher la dessiccation, matrice de micro-encapsulation pour les engrais, pesticides et aliments. Tissus hypoallergiques cicatrisant les plaies	<i>Pseudomonas, Azotobacter</i>	(Hay <i>et al.</i> , 2013)
	Emulsane	D-galactosamine, acide D-galactosaminouronique, di-deoxy-di-amino hexose, des ramifications d'acides gras lié avec O-acyl ou N-acyl	Anionique	Amphipatique, capacité d'agir comme un émulsifiant biologique	Récupération de pétrole brut. Les autres applications sont identiques à celles de l'alginate	<i>Acetobacter calcoaceticus</i>	(Dams-Kozłowska <i>et al.</i> , 2008)
	Succinoglycane	D-glucose et D-galactose, ratio 7:1 avec radicaux acétate, pyruvate ou succinate conférant des propriétés anioniques	Anionique	Solution aqueuse et visqueuse, rhéo-fluidifiant, stabilité aux acides	Agent gélifiant. Les autres applications sont identiques à celles du curdlan.	<i>Sinorhizobium, Agrobacterium, Azospirillum, Alcaligenes faecalis</i>	(Hebbar <i>et al.</i> , 1992)
	Xanthane	D-glucose, D-mannose et acide D-glucuronique	Anionique	Hydrocolloïde, viscosité élevée à faible taux de cisaillement même à faible concentration ; stable dans une large gamme de température, pH, concentration en sel	Agent viscosifiant, stabilisant, émulsifiant, de suspension dans l'industrie agro-alimentaire. Pour les aliments comme agent épaississant et stabilisant, souvent utilisé en combinaison avec la gomme de guar, dans la récupération secondaire et tertiaire du pétrole brut, dans la formulation des peintures, pesticides et détergents; en cosmétique ; les encres d'impression (pour contrôler la viscosité, dépôt et gélification)	<i>Xanthomonas campestris</i>	(Petel Petel et Prajapati, 2013 ; Freitas <i>et al.</i> , 2011)
	Gellane	glucose, rhamnose, acide glucuronique, acétate, glycérate	Anionique	Hydrocolloïde, stable dans large gamme de pH, capacité gélifiante, gels thermoréversibles	Agent stabilisant et de suspension dans les aliments. Agent gélifiant pour solidifier le milieu de culture, en particulier pour l'étude des micro-organismes marins	<i>Pseudomonas</i>	(Giavasis <i>et al.</i> , 2000)
	Acide hyaluronique	acide glucuronique, N-acétyl glucosamine	Anionique	Adopte une conformation semi-rigide en solution, remarquable rétention d'eau	Substituant du fluide d'œil dans la chirurgie oculaire, dans le liquide des larmes artificielles, réplique du liquide synovial, dans la cicatrisation des plaies, industrie cosmétique (lotions, agent hydratant)	<i>Streptococcus</i>	(Chong <i>et al.</i> , 2005)

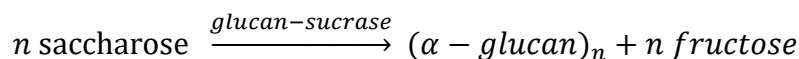
2. Biosynthèse et localisation des EPS bactériens

Selon Whitfield (1988), les processus de biosynthèse des EPS sont divisés en deux catégories, basés généralement sur leurs voies de biosynthèse et d'assemblage. Ainsi nous distinguons la biosynthèse extracellulaire et la biosynthèse intracellulaire.

2.1. Biosynthèse extracellulaire

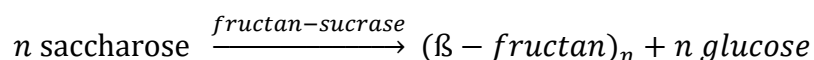
Les EPS synthétisés extracellulairement sont en général de deux types : les α -glucanes et les fructanes. Les enzymes impliquées dans ce processus sont respectivement les glucane-sucrases et les fructane-sucrases. La synthèse extracellulaire des α -glucanes est caractéristique des bactéries lactiques tandis que celle des fructanes est commune aux protéobactéries et aux firmicutes.

Les **glucane-sucrases** synthétisent uniquement des polymères de type α -glucanes et catalysent la réaction suivante :



Ces enzymes catalysent donc le clivage de la liaison glycosidique de son substrat, le saccharose, et fixe le glucose issu du clivage à un glucane en croissance (transglucosylation). L'énergie libérée par le clivage de la liaison glycosidique dans le saccharose est utilisée dans la synthèse de la nouvelle liaison glycosidique. Ainsi peuvent être synthétisés divers polymères qui diffèrent dans leur ramification. Dans ce groupe on trouve le dextrane, qui est un glucane linéaire avec des liaisons α -(1→6), l'alternane, le mutane et le reuterane qui peuvent être ramifiés et contenir des liaisons α -(1→3) et α -(1→4) (Monchois *et al.*, 1999). Ces EPS sont retrouvés chez les genres bactériens *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Lactococcus* (Monchois *et al.*, 1999 ; Kralj *et al.*, 2004).

Les **fructane-sucrases** sont de deux types : lévane-sucrase et inulo-sucrase, qui synthétisent respectivement du lévane ou de l'inuline. Les inulo-sucrases sont uniquement présentes chez les bactéries lactiques, tandis que les lévane-sucrases sont décrites chez les protéobactéries (*Zymomonas*, *Gluconacetobacter*) et les firmicutes (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*). Ces enzymes sont impliquées dans la réaction suivante :



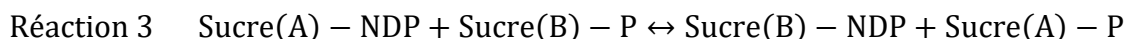
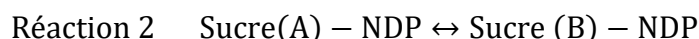
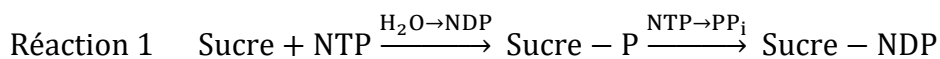
De la même façon que les glucane-sucrases ces enzymes clivent la liaison glycosidique du saccharose, et l'énergie libérée est utilisée pour fixer le fructose à un fructane en croissance (trans-fructosylation) ou bien à un autre accepteur comme le raffinose. Ainsi sont synthétisés les lévanes et les inulines. Les lévanes sont des homopolymères de fructose avec des liaisons β -(2→6) et parfois des ramifications de type β -(2→1). Les inulines sont des homopolymères de fructose avec des liaisons β -(2→1) et des ramifications de type β -(2→6) (van Hijum *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que dans l'industrie, ces EPS peuvent être produits soit avec des cultures bactériennes, soit avec des enzymes immobilisées, car le processus de synthèse est extracellulaire (Cerning, 1990).

2.2. Biosynthèse intracellulaire

La plupart des EPS bactériens sont synthétisés intracellulairement, impliquant un mécanisme similaire de celui de la synthèse de la paroi cellulaire, puis sont exportés dans l'espace extracellulaire comme des macromolécules (Margaritis et Pace, 1985 ; Rehm, 2009). Les voies de biosynthèse des EPS bactériens incluent : (i) l'absorption du substrat (ii) la dégradation du substrat dans les voies métaboliques centrales et l'activation des monosaccharides par la formation de molécules "nucléotides+monosaccharide" (iii) l'assemblage des unités répétitives par l'addition des monosaccharides sur des lipides isoprènes et polymérisation des unités répétitives ou polymérisation directement des monosaccharides activés et enfin (iv) la sécrétion ou export du polysaccharide à travers la membrane cytoplasmique (Freitas *et al.*, 2011 ; Sutherland, 1972 ; Sutherland, 2001b). Plusieurs enzymes sont impliquées dans la synthèse d'un EPS. Parmi ces enzymes celles impliquées dans l'absorption du substrat, celles de la dégradation du substrat et celles de l'activation des monosaccharides sont également impliquées dans d'autres voies métaboliques. Les enzymes ayant une fonction spécifique dans le processus de synthèse des EPS sont les transférases, qui forment des unités mono- ou oligosaccharidiques, et les translocases/polymérases, qui synthétisent et exportent les polysaccharides (Sutherland, 1972 ; Whitney *et al.*, 2013).

La première étape est l'absorption du substrat et si ces sont des mono- ou oligosaccharides, il se fait par une diffusion facilitée qui s'exerce grâce aux transporteurs et aux canaux protéiques. Une fois absorbés dans la cellule, les mono- ou oligosaccharides sont catabolisés, dans la plupart des cas, suite à une phosphorylation, ou transportés et oxydés par une voie périplasmique d'oxydation directe. Ce dernier mécanisme n'a été décrit que chez certaines bactéries. Les deux systèmes existent chez les bactéries productrices d'EPS et peuvent fonctionner simultanément si le substrat est disponible (Schaechter *et al.*, 2004). Dans le cytoplasme les voies métaboliques sont la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. La voie d'Entner-Doudoroff est utilisée plus rarement et seulement chez quelques bactéries (*Pseudomonas*, *Azotobacter*, *E. coli*, *Rhizobium*...). Quand le substrat est en excès, son catabolisme peut commencer avec la voie du méthylglyoxal. Les molécules issues de ces voies métaboliques sont utilisées pour la synthèse des monosaccharides. Tous les monosaccharides requis pour la synthèse des polysaccharides sont synthétisés à partir des métabolites issus de ces voies métaboliques à l'intérieur de la cellule ou importés dans la bactérie. À partir du métabolisme du glucose, peuvent être synthétisés les monosaccharides les plus fréquemment identifiés dans les EPS tels que le fructose, le mannose, le galactose, le xylose, le rhamnose, l'arabinose, mais également des monosaccharides moins fréquents tels que l'apiose, le fucose, le tagatose, le sorbose, le talose, le psicose, l'altrose, et l'allose (Freeze *et al.*, 2009 ; Adibekian *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2013).

Pour la synthèse des polysaccharides, les formes actives des monosaccharides sont requises. Ces sont les formes riches en énergie, en général des nucléosides-diphosphates fixés aux monosaccharides (NDP-oses). L'obtention des NDP-oses nécessite des nucléosides-triphosphates (comme l'UTP ou GTP) et un glycosyl-1-phosphate (monosaccharide avec un phosphate sur le carbone anomérique) (Freeze *et al.*, 2009). Les nucléosides-monophosphates comme le CMP NeuAc, et les phospholipides comme dolichol-phosphate oligosaccharide sont également utilisés, mais plus rarement (Lairson *et al.*, 2008). Différentes variations sont possibles pour la synthèse des NDP-oses, mais, quel que soit le monosaccharide, tous doivent être activés par une kinase (réaction 1) ou produit à partir d'un NDP précédemment synthétisé et activé (réaction 2 et 3) :



Ces réactions impliquent des enzymes de la famille des kinases, des isomérases et des nucléotidyltransférases. La plupart des monosaccharides activés impliquent l'UDP, mais certains comme le mannose et le fucose sont activés par le GDP (Freeze *et al.*, 2009).

L'étape suivante représente la biosynthèse des glycanes qui est principalement déterminée par l'assemblage des fragments monosaccharidiques dans des chaînes linaires ou ramifiées par les glycosyltransférases (GTs). Toutes les GTs étudiées jusqu'à présent sont des enzymes non-processives qui dissocient le produit après la synthèse et doivent refixer le polymère pour l'élongation d'une unité saccharidique (Peterson *et al.*, 2009; Freiburger *et al.*, 2007; Vionnet *et al.*, 2007). Elles catalysent le transfert séquentiel de donneurs activés (NDP-oses) sur une molécule spécifique "accepteur" comme les lipides ou les monosaccharides, formant ainsi une liaison glycosidique (Hashimoto *et al.*, 2009). Généralement chaque GT a un substrat spécifique, avec peu d'exceptions, et utilise un seul type de NDP-oses. La synthèse de la grande diversité des structures polysaccharidiques trouvés dans la nature implique l'intervention d'un grand nombre de glycosyltransférases (GTs) (Aharoni *et al.*, 2006). Les GTs représentent environ de 1 à 2 % des produits des gènes d'un organisme (eucaryote, archée ou bactérie) (Lairson *et al.*, 2008). Comme la plupart des monosaccharides activés sont des UDP-oses, la majorité des GTs identifiés sont des UDP-glycosyltransférases (Hu et Walker, 2002).

Malgré la grande diversité biochimique des EPS bactériens et des unités répétées qui les constituent, les mécanismes moléculaires par lesquels ces biopolymères sont assemblés intracellulairement et sécrétés par la cellule appartiennent à trois catégories. Les deux premières sont les voies dépendantes de transporteurs de type Wzx/Wzy et de type ABC qui utilisent un accepteur lipidique pour initier la synthèse d'EPS. La troisième catégorie est dépendante d'une synthase pour laquelle le besoin d'une molécule lipidique comme accepteur dépend de l'EPS synthétisé (Whitney *et al.*, 2013). Ces trois mécanismes sont brièvement décrits ci-après.

2.2.1. Les transporteurs Wzx/Wzy

La voie dépendant de transporteurs Wzx/Wzy est responsable de la synthèse de plusieurs glycopolymères membranaires chez les bactéries et les archées (Islam et Lam, 2013). Ces glycopolymères de surface incluent des lipopolysaccharides, l'antigène O (antigène commun des entérobactéries), l'exosporium, les exopolysaccharides et les polysaccharides capsulaires (Islam et Lam, 2014). L'assemblage commence dans le cytoplasme où s'effectue la synthèse d'unités répétées polysaccharidiques liées aux lipides (A dans la Fig. 1). Une glycosyltransférase initiatrice ajoute le premier saccharide sous forme de précurseur nucléosidique activé (NDP-ose) sur une molécule lipidique poly-isoprénoïde porteuse, l'undécaprényl-phosphate (UndPP, C₅₅P). Ce dernier se trouve sur le feuillet interne de la membrane cellulaire interne chez les bactéries ayant une paroi Gram-négative. Ainsi le monosaccharide forme une liaison pyrophosphate avec le transporteur UndPP (Islam et Lam, 2014). Des additions ultérieures par des glycosyltransférases spécifiques, intégrées ou associées à la membrane interne, entraînent la synthèse d'une unité répétée polysaccharidique liée à UndPP, puis une

série de protéines d'assemblage de la membrane interne continuent le processus (Mulford et Osborn, 1983 ; McGrath et Osborn, 1991). Les unités répétées liées aux UndPP sont dirigées du feuillet interne vers le feuillet externe par la flippase Wzx (B dans la Fig. 1) où elles sont polymérisées par la glycosyltransférase Wzy, via un mécanisme de capture et de libération (C-D dans la Fig. 1) (Islam et Lam, 2013 ; Woodward *et al.*, 2010). Les flippases Wzx sont classées dans la famille des transporteurs de polysaccharides (Hvorup *et al.*, 2003). Les Wzx et Wzy sont des enzymes largement répandues, leur homologie entre espèces bactériennes étant assez faible (Islam et Lam, 2013). La longueur de la chaîne polysaccharidique synthétisée est régulée par la copolymérase de polysaccharide (Wzz), suivant un mécanisme de récupération d'informations et d'orientation de la chaîne (E dans la Fig. 1). Une fois la longueur finale est atteinte, la chaîne polysaccharidique est relâchée par une voie de translocation (F dans la Fig. 1). Ce processus peut être une réaction secondaire de Wzy ou WaaL. Donc, Wzy doit avoir la possibilité de relâcher le polysaccharide, en cours de synthèse, du porteur lipidique pendant la polymérisation, et WaaL exécute essentiellement l'étape de clivage quand il transfère le glycane sur le lipid-A (Whitfield, 2006). Une démonstration de la formation de la liaison entre la chaîne polymérisée de l'antigène-O et la protéine Wzz a été faite avec la détection de Wzz₁ et Wzz₂ en copurification avec l'UndPP lié à l'antigène-O chez *Pseudomonas aeruginosa* (Daniels *et al.*, 2002). Chez les bactéries à Gram-positif possédant le système Wzx/Wzy, les protéines nécessaires pour l'export d'EPS par la membrane externe sont absentes (Broadbent *et al.*, 2003 ; Yother, 2011 ; Whitfield et Roberts, 1999).

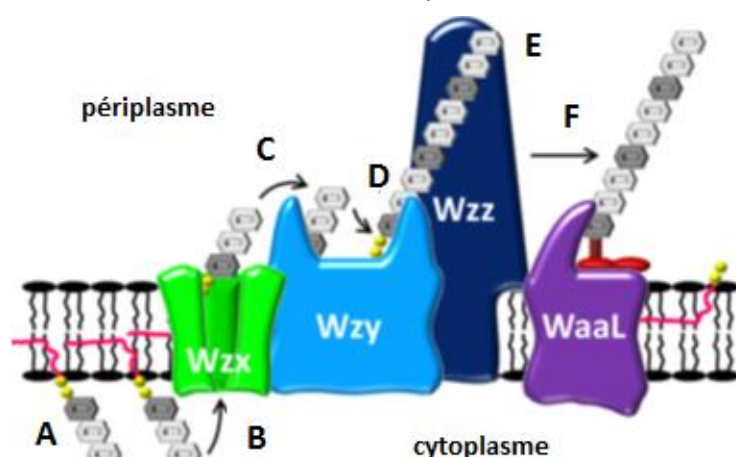


Figure 1 : Schéma de la voie de synthèse et du transport des EPS, dépendante des transporteurs Wzx/Wzy. Les étapes successives de ce processus sont indiquées avec les lettres de A à F (Islam et Lam, 2014)

2.2.2. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) permettent l'import ou l'export de divers substrats à travers les membranes biologiques requérant l'hydrolyse de l'ATP. Ils contiennent deux domaines, un transmembranaire (DTM) et un qui lie les nucléotides (DLN). Ce dernier contient des motifs Walker A et Walker B (nécessaires à la fixation de l'ATP) et des motifs supplémentaires qui caractérisent la superfamille des transporteurs ABC. Les deux domaines peuvent être présents comme des polypeptides individuels ou peuvent être fusionnés avec des protéines (Whitfield, 2006). Certains membres de la

superfamille des transporteurs ABC sont impliqués dans la translocation des glucides complexes à travers la membrane cellulaire.

En comparaison avec le système Wzx/Wzy, le transport de type ABC suit une voie de sécrétion complètement différente. Ce système de transport et de synthèse polysaccharidique est principalement impliqué dans la synthèse des CPS bactériens comme ceux d'*E. coli*, d'*Haemophilus*, de *Neisseria*, de *Rhizobium* et d'*Agrobacterium* (Whitney et Howell, 2013 ; Whitfield, 2006). La synthèse des EPS bactériens par le système ABC a également été bien décrite, même si elle est moins répandue (Becker *et al.*, 1995 ; Yamanaka *et al.*, 2012). Les transporteurs de type ABC concernent l'export de polysaccharides capsulaires chez les bactéries à Gram-négatif. L'exemple classique du transport de polysaccharide par le système ABC est celui de la synthèse et de l'export du CPS groupe II d'*E. coli*. Dans ce cas, la synthèse du polymère est initiée par l'addition des oses activés sur un accepteur lipidique qui varie en fonction du polysaccharide synthétisé (Cuthbertson *et al.*, 2009). Cet accepteur lipidique se trouve du côté cytoplasmique de la membrane interne (Troy, 1992) (Fig. 2, processus A). Plusieurs études ont essayé de déterminer sa nature. Tout d'abord, il a été suggéré que le glycane était assemblé comme un intermédiaire lié à Und-PP, comme dans le cas de la plupart des O-polysaccharides (Raetz et Whitfield, 2002). Des travaux plus récents de Willis et Whitfield *et al.* (2013a) suggèrent que l'accepteur lipidique est le diacyl- ou monoacyl phosphatidylglycérol impliquant un poly-Kdo linker. Cependant, il n'est toujours pas confirmé à quelle étape les CPSs sont attachés à la fraction lyso-phosphatidylglycérol via l'unique poly-Kdo linker : à l'initiation de la polymérisation, pendant ou à la fin du processus. Il est suggéré que ce lipide est impliqué aussi dans la fixation du CPS à la surface cellulaire (Fischer *et al.*, 1982 ; Jann et Jann, 1990). Whitfield (2006) propose que la chaîne polysaccharidique soit assemblée entièrement et que l'extrémité réductrice du produit final soit liée par la suite au porteur lipidique (Fig. 2, processus B). En tout cas, ce qui est connu est que l'initiation du transfert de premier résidu de l'unité répétée se fait par une glycosyltransférase d'initiation et que chaque cluster de gènes sérotype-spécifiques possède au moins un gène candidat codant pour glycosyltransférase d'initiation. Par exemple chez *E. coli* K1, le gène candidat est le gène *neuE* et chez *Pasteurella multocida* Type A, le gène candidat est *hyaE* (Willis et Whitfield, 2013a). Par la suite, plusieurs GTs contribuent à l'élongation du polysaccharide par addition séquentielle des oses activés à l'extrémité non-réductrice de la chaîne (Bliss et Silver, 1996 ; Moxon et Kroll, 1990 ; Vimr *et al.*, 1995). À la fin de la synthèse, le polysaccharide est exporté. L'orientation du substrat polymérique pendant l'export n'est pas établie, et les deux processus "biosynthèse" et "export" peuvent être temporairement couplés. Le transport à travers la membrane cellulaire se fait via un transporteur de type ABC et plus particulièrement via KpsM et KpsT (Whitfield, 2006 ; Raetz et Whitfield, 2002 ; Cuthbertson *et al.*, 2010) (Fig. 2, processus C). Le KpsM est la composante transmembraire (DTM) de la membrane interne et le KpsT est le domaine de liaison aux nucléotides (DLN) cytoplasmique. D'autres protéines sont également impliquées : KpsS et C sont essentielles pour le transport. Les protéines KpsC sont largement distribuées parmi les bactéries qui possèdent un polysaccharide capsulaire similaire à la capsule de type II d'*E. coli* (Vimr et Steenbergen, 2009). Il a été proposé que KpsC et KpsS soient impliquées dans la synthèse de poly-Kdo linker et/ou à la fixation du fragment lipidique (diacyl- ou monoacyl phosphatidylglycérol) sur l'extrémité réductrice de la chaîne polysaccharidique (Fig. 2, processus A). Avant l'export de la deuxième chaîne, un acyle est éliminé par une phospholipase A non encore identifiée (Willis et Whitfield, 2013). La fonction de KpsC et KpsS est démontrée par le fait que des

mutants $\Delta kpsCS$ d'*E. coli* accumulent, dans leur cytoplasme, un polysaccharide capsulaire sans fragment lipidique (Vimr et Steenbergen, 2009). Toutefois, une étude du mutant de *Neisseria meningitis* sérotype B déficient dans l'homologue de KpsC montre que le polysaccharide capsulaire est associé au fragment lipidique mais que son export n'a pas lieu (Tzeng *et al.*, 2005). La proposition que KpsC fournisse un adaptateur essentiel entre les enzymes impliquées dans la biosynthèse et le transporteur ABC semble d'être une hypothèse alternative convaincante. Les données de deux études ont établi que le KpsC oligomérise et interagit en même temps avec NeuS et KpsE (Steenbergen et Vimr, 2008). Les protéines KpsF et KpsU participent également au processus de synthèse et export du polysaccharide selon des mécanismes qui ne sont pas encore connus. La translocation à travers le périplasma et la membrane externe nécessite les protéines KpsE et KpsD formant un complexe protéique et qui sont respectivement une protéine putative fusionnant les membranes (adaptateur) et une protéine de la membrane externe auxiliaire (de la famille OMA) (Fig. 2, processus D). La protéine KpsE est ancrée dans la membrane interne et appartient à la famille des copolymérase de polysaccharides (PCP-3) (Cuthbertson *et al.*, 2009). Cette translocation est un processus coordonné et proposé comme étant analogue à l'action de pompes à efflux triparties (Cuthbertson *et al.*, 2009 ; Whitfield, 2006 ; Vimr et Steenbergen, 2009). Enfin, KpsD et KpsE sont des protéines essentielles pour l'export d'EPS sachant que les mutants d'*E. coli*, affectés dans la synthèse de ces protéines, accumulent le polysaccharide dans le périplasma (Bronner *et al.*, 1993; Pazzani *et al.*, 1993 ; Silver *et al.*, 1987).

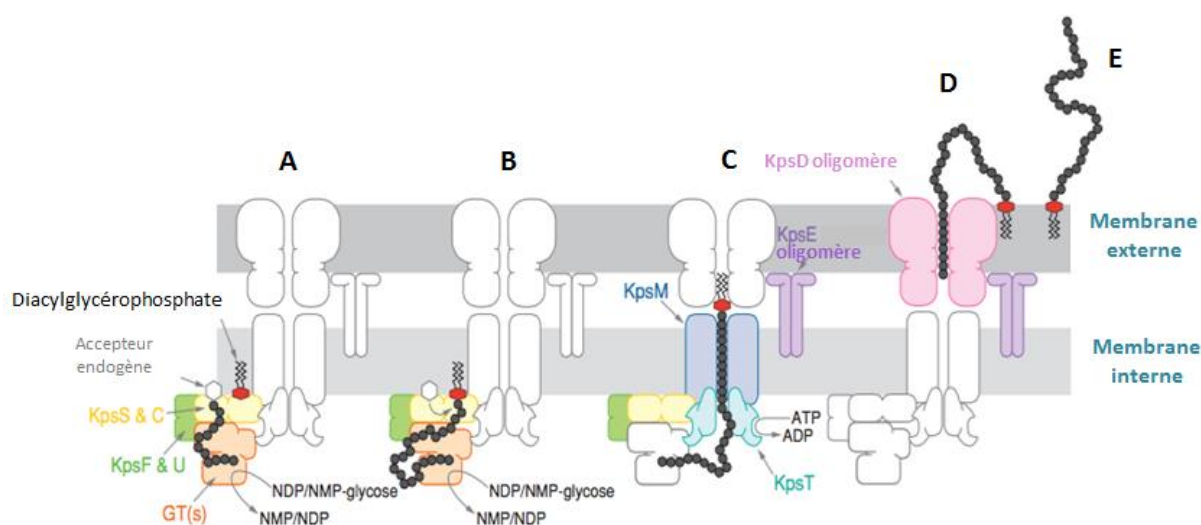


Figure 2 : Schéma de la voie de synthèse et transport des CPS, dépendante du système de transport ABC. Les étapes successives de ce processus sont indiquées avec les lettres de A à E (Whitfield, 2006)

Le processus par lequel le système d'export de type ABC implique son substrat est inconnu, sachant que la composante KpsMTED ne reconnaît pas spécifiquement la chaîne polysaccharidique (Rahn *et al.*, 1999; Reid et Whitfield, 2005 ; Roberts *et al.*, 1986 ; Lo *et al.*, 2001). L'hypothèse visant à expliquer ce phénomène est que le complexe protéique reconnaît l'extrémité lipidique conservée (Whitfield, 2006 ; Cuthbertson *et al.*, 2010 ; Silver *et al.*, 2001 ; Roberts *et al.*, 1988). Une autre hypothèse suggère que l'interaction "protéine-protéine" du complexe multiprotéique favorise un couplage direct de la synthèse et de l'export et crée ainsi une situation où l'export peut

commencer avant la reconnaissance du substrat (Vimr et Steenbergen, 2009 ; Steenbergen et Vimr, 2008). Par exemple chez *E. coli*, il est établi qu'il existe une interaction entre les enzymes impliquées dans la synthèse de polysaccharide et le complexe KpsMTED (McNulty *et al.*, 2006 ; Rigg *et al.*, 1998).

Suite à ce processus de synthèse et d'export, les chaînes polysaccharidiques néoformées restent fixées à la surface de la cellule (Bliss et Silver, 1996; Roberts, 1996) (Fig. 2 E). La longueur de ces chaînes polysaccharidiques est génétiquement déterminée. La régulation de la longueur de chaîne polysaccharidique se fait par l'activité d'enzymes d'élongation de la chaîne et les transporteurs ABC. La synthèse et l'export sont coordonnés, conduisant à une stabilité de la longueur de la chaîne et donc de la masse moléculaire du polymère. Des mutations affectant l'une des protéines KpsC, KpsS, KpsT ou KpsE se traduisent par des CPS de plus haute masse moléculaire, en cohérence avec cette hypothèse (Willis *et al.*, 2013; Larue *et al.*, 2011).

Les protéines d'export du système ABC possèdent des similarités d'une espèce bactérienne à l'autre (Roberts *et al.*, 1986 ; Lo *et al.*, 2001 ; Silver *et al.*, 1987). Il existe également des similarités entre systèmes Wzx/Wzy et ABC. Tandis que les étapes initiales d'assemblage de la chaîne polysaccharidique sont différentes, les protéines d'export appartient aux mêmes familles PCP et OPX suggérant que la dernière étape implique des mécanismes conservés (Cuthbertson *et al.*, 2009 ; Morona *et al.*, 2009). Enfin, même chez les transporteurs de type ABC, il existe toujours des exceptions à la règle et certaines protéines peuvent être différentes d'une espèce à l'autre. Par exemple, la production du CPSVIAg de *Salmonella enterica* sérovar *Typhi* met en jeu un transporteur ABC sans protéines KpsCS. À la place, il existe un gène (*vexE*) dont le produit a certaines similarités avec les acyltransférases (Virlogeux *et al.*, 1995 ; Wetter *et al.*, 2012).

2.2.3. Biosynthèse et transport dépendants d'une synthase

Il existe également un système d'export des EPS dépendant d'une synthase et impliquant des protéines différentes d'OPX et de PCP. Une glycosyltransférase, incluse dans la membrane interne, est impliquée dans la formation du polysaccharide et dans sa translocation (Whitney et Howell, 2013). Ces deux processus sont effectués par une seule protéine qui, dans certains cas, comme pour l'alginate et la cellulose, est une sous-unité d'un complexe multiprotéique traversant la paroi cellulaire (Rehm, 2010). La double fonction de cette protéine se traduit par le fait qu'elle synthétise des polysaccharides moins complexes. Cette voie est impliquée plutôt dans l'assemblage d'homopolymères nécessitant un seul type de précurseur saccharidique. C'est par exemple le cas de la biosynthèse du curdlane qui est constitué uniquement d'unités glucosidiques liées en β -(1→3) et de la cellulose bactérienne, constituée d'unités glucosidiques liées en β -(1→4) (Whitney et Howell, 2013). L'alginate est un autre exemple du polysaccharide synthétisé par un seul précurseur, la différence dans ce cas provient du fait que certaines unités sont modifiées par la suite. Une grande partie du polymère de l'alginate est un polymannuronate modifié par différentes épimérases et par d'autres enzymes, conduisant à la formation d'un polymère associant des résidus d'acide mannuronique et des résidus d'acide glucoronique en proportions variables (Rehm et Valla, 1997). Un autre exemple impliquant ce système "synthase-dépendant" est celui de l'acide hyaluronique. Sa biosynthèse et sa sécrétion sont catalysées par une seule enzyme (hyaluron-synthase), à partir d'une unité répétée constituée de deux disaccharides liés en β -(1→4), et constitués eux-mêmes d'acide glucoronique et de N-

acétylglucosamine liés en β -(1 $\rightarrow$ 3) (Chong *et al.*, 2005).

Le mécanisme de synthèse et de transport des EPS par cette voie synthase-dépendante est bien étudié chez les bactéries à Gram négatif. Cette voie implique quatre composantes clés : une polysaccharide-synthase intégrée à la membrane interne, une protéine de scaffold contenant un motif tétratricopeptide (TRP), une porine à tonneau β de la membrane externe et une protéine régulatrice dont la molécule "signal" est le (3'-5') di-guanosine-monophosphate cyclique (di-GMPc). Le schéma de fonctionnement de ces quatre composantes est simple (Fig. 3). Le signal d'activation de la production du polysaccharide est donné par le di-GMPc et la polymérisation du polysaccharide commence (Whitney et Howell, 2013). Elle s'effectue par la synthase sur la face cytoplasmique de la membrane cellulaire. Ce type de synthèse peut se produire en présence ou en l'absence d'un accepteur lipidique, en fonction du polysaccharide synthétisé (Cartee *et al.*, 2001 ; Hashimoto *et al.*, 2011). Par exemple la synthèse de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus equimilis* se fait en absence de précurseur lipidique (Hubbard *et al.*, 2012). La chaîne polysaccharidique complète est sécrétée à travers de la paroi cellulaire par la synthase et la porine à tonneau β . La protéine de scaffold protège la chaîne polysaccharidique de la dégradation dans la périplasmie et effectue son guidage vers la porine à tonneau β (Jain et Ohman, 1998 ; Keiski *et al.*, 2010 ; Whitney *et al.*, 2011). Dans ce processus, il est possible que d'autres protéines puissent être impliquées. Par exemple dans le cas de l'alginate, des protéines périplasmiques de transfert de l'acétate sont également présentes (Whitney et Howell, 2013).

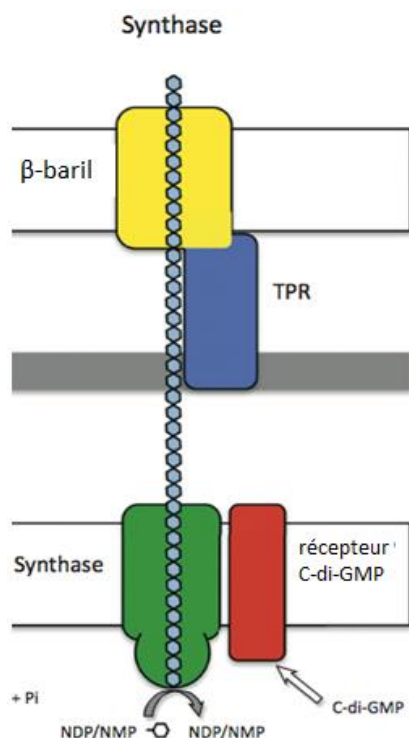


Figure 3 : Schéma de la voie de synthèse et transport des EPS, synthase-dépendante (Whitney et Howell, 2013)

2.3. Localisation de gènes de la synthèse d'EPS

Chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, les enzymes nécessaires à la synthèse et au transport des EPS sont codées par des clusters de gènes souvent

organisés en opérons (Whitfield et Roberts, 1999). Ces opérons peuvent également inclure des gènes impliqués dans la synthèse des précurseurs, ainsi que des gènes régulateurs (Whitney et Howell, 2013 ; Schmid *et al.*, 2015). Dans la majorité des cas, d'autres gènes que ceux retrouvés dans ces clusters sont nécessaires à la synthèse des EPS. C'est le cas par exemple des gènes codant la synthèse des précurseurs NDP-oses qui sont également impliqués dans d'autres voies métaboliques et ne se trouvent pas forcément dans ces clusters.

3. Méthodes d'analyse de la structure des EPS

Selon Flemming et Wingender (2001b) les constituants majoritaires des exopolymères bactériens sont des polysaccharides, des lipides, des protéines et des acides nucléiques en concentrations qui varient d'une espèce à l'autre (Tableau 3).

Tableau 3 : Taux des différents composants dans les exopolymères bactériens qui varient selon les espèces bactériennes (d'après Flemming et Wingender, 2001b)

Composés	Pourcentage dans les exopolymères (%)
Polysaccharides	40-95
Protéines	1-60
Lipides	1-40
Acides nucléiques	1-10

Les EPS sont des composés ayant généralement un caractère hydrophile dû à leurs constituants monosaccharidiques qui possèdent des groupements hydroxyles facilement hydratables (Nichols *et al.*, 2005a). Selon la composition de leur unité répétée, il s'agit d'homopolysaccharides, constitués du même type de monosaccharide, ou d'hétéropolysaccharides, constitués de deux ou plusieurs types de monosaccharides. Dans tous les cas, il s'agit des structures répétitives (n fois l'unité répétée). Selon leur structure, les polysaccharides peuvent être linéaires ou ramifiés, avec différents degrés de ramification. Ces macromolécules sont souvent hétérogènes, contenant des modifications sur les unités répétées. La diversité structurelle des EPS est liée aux différents types de monosaccharides constitutifs, aux types de liaisons entre monosaccharides, et à la nature et au nombre de substituants (Kenne et Lindberg, 2005a). Dans leur revue, Nichols *et al.* (2005a) ont établi une liste des composants saccharidiques ou autres des exopolysaccharides bactériens (Tableau 4).

Tableau 4 : Liste des constituants des EPS bactériens

Type	Composé	Exemple	Type de liaison
Sucres	Pentoses	Arabinose	
		Ribose	
		Xylose	
	Hexoses	Glucose	
		Mannose	
		Galactose	
		Fructose	
		Allose	
		Rhamnose	
		Fucose	
	Sucres aminés	Glucosamine	
		Galactosamine	
	Acides uroniques	Acide glucuronique	
		Acide galacturonique	
		Acide mannuronique	
		Acide guloronique	
Autres	Acide acétique		O-Acyl, N-Acyl
	Acide succinique		O-Acyl
	Acide pyruvique		Acétal
	Acide phosphorique		Ester, Diester
	Acide sulfurique		Ester

L'élucidation de la structure d'un EPS se fait par des analyses structurales incluant celle de la composition en monosaccharides, de la présence et du type de leurs substituants, de la nature des liaisons, de leur anomérie et de leur conformation. Les difficultés liées à l'analyse des EPS sont généralement dues aux faibles quantités de matières extraites, mais également au choix des méthodes de caractérisation et de leurs combinaisons. L'analyse structurale des polysaccharides est un exercice souvent difficile, nécessitant la mise en œuvre de nombreuses méthodes complémentaires qui peuvent être de nature chimique et enzymatique pour l'extraction et la purification, et physique pour l'analyse.

3.1. Analyse de la composition en monosaccharides

Pour connaître la composition d'un EPS en monosaccharides, il faut d'abord l'hydrolyser en utilisant le plus souvent un acide et une haute température. Par la suite plusieurs techniques peuvent être utilisées pour déterminer la nature des monosaccharides libérés. Par exemple, les analyses colorimétriques peuvent déterminer la présence des acides uroniques. Certaines méthodes d'HPLC peuvent donner de l'information sur la nature des oses neutres. Cependant la méthode la plus classique

pour l'élucidation de la composition en monosaccharides neutres reste l'analyse en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

3.1.1. Hydrolyse de l'EPS

Le dosage et l'identification des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessitent la rupture de toutes les liaisons glycosidiques. La dépolymérisation est conduite avec des acides forts à des concentrations variables, sous diverses conditions opératoires (température, temps de réaction), en fonction de la nature et de la structure du polysaccharide. En effet, les différents types de liaisons osidiques présentent des taux d'hydrolyse variables en fonction de la stabilité relative de ces liaisons ($1 \rightarrow 6' > 1 \rightarrow 4' > 1 \rightarrow 3' > 1 \rightarrow 2'$). De même, la nature de deux unités osidiques contiguës présente une différence de stabilité de la liaison glycosidique. Par exemple les liaisons glycosidiques entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine seront plus difficiles à rompre que des liaisons entre un ose et un autre ose sous la forme furanose, anhydro- ou déoxy- (Ciancia et Cerezo, 1993 ; Stephen *et al.*, 1990 ; Lindberg *et al.*, 1975). Les liaisons glycosidiques ne se rompent pas toutes à la même vitesse et avec la même énergie, le temps d'hydrolyse doit être suffisamment long pour rompre toutes les liaisons de l'EPS. Il faut également prendre en compte que les monosaccharides libérés pendant l'hydrolyse acide sont sensibles à la dégradation. Par exemple une température trop élevée du milieu réactionnel provoque la dégradation de certains oses, notamment le xylose (Blakeney *et al.*, 1983). De même certains oses libérés peuvent être modifiés pendant l'hydrolyse. On constate par exemple que, lors de l'hydrolyse entre un carbone C₁ d'un cycle furanose et celui d'un cycle pyranose, le cycle furanose se réarrange en cycle pyranose. Les acides uroniques, une fois hydrolysés, peuvent être rapidement lactonisés. Pour une hydrolyse optimale, les conditions doivent être optimisées, selon le type de polysaccharide, ce qui est un véritable challenge quand la composition de l'EPS est encore inconnue.

Trois acides sont utilisés pour la monomérisation des polysaccharides – HCl, H₂SO₄ et l'acide trifluoroacétique (TFA), les plus fréquemment utilisés étant : H₂SO₄ et TFA. L'hydrolyse des polysaccharides avec H₂SO₄ est décrite comme étant la plus efficace par rapport au TFA parce qu'elle permet leur hydrolyse presque totale (Garleb *et al.*, 1989). Néanmoins, H₂SO₄ peut dégrader certains oses, surtout les pentoses, et les acides uroniques par décarboxylation. Un autre désavantage de l'acide sulfurique est qu'après l'hydrolyse, les ions sulfates sont difficiles à éliminer. L'hydrolyse avec TFA est parfois préférée, car elle provoque moins de dégradation des monosaccharides et peut être éliminé complètement par évaporation (Hon et Shiraishi, 2000). L'hydrolyse des polysaccharides avec HCl est moins utilisée. Une autre possibilité est l'emploi de méthanol chlorhydrique, le processus d'hydrolyse s'appelant alors la méthanolyse. Suite à cette réaction, après le clivage des liaisons glycosidiques, les monosaccharides libérés sont sous forme de méthylglycosides qui présentent une très forte stabilité en solution. Cette méthode peut avoir certains avantages par rapport à l'hydrolyse avec H₂SO₄ ou le TFA, car elle est aussi efficace et provoque moins de dégradation des monosaccharides, présentant une conversion quasi-totale en méthylglycosides stables en solution (Chambers et Clamp, 1971).

3.1.2. Méthodes de dosage colorimétriques des oses neutres et des acides uroniques

Les méthodes colorimétriques sont des techniques de dosage simples et rapides à mettre en œuvre. Les chromophores formés absorbent dans le domaine du visible, proportionnellement à la quantité d'oses présents, et ainsi permettent leur quantification par spectrométrie. Ils permettent de doser de manière globale les oses et de manière spécifique les acides uroniques. Le principe des dosages colorimétriques peut reposer sur différentes réactions, en fonction de l'indicateur colorimétrique utilisé.

Une partie des méthodes colorimétriques est basée sur le fait que les aldoses sont des réducteurs grâce à leur fonction hémiacétalique (pseudoaldéhydrique). Ainsi à chaud et en milieu alcalin, il se produit une réduction des indicateurs colorimétriques, comme l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS), la liqueur de Fehling et le réactif de Nelson-Somogy, par les oses réducteurs. L'inconvénient de ce dosage colorimétrique est que seuls les oses réducteurs, comme le glucose, peuvent être quantifiés, contrairement aux cétooses comme le fructose (Gusakov *et al.*, 2011).

D'autres méthodes sont basées sur la condensation par estérification d'un chromogène, par exemple l'anthrone, l'orcinol ou le phénol, avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en dérivés du furfural, le 5-hydroxyméthylfurfural et l'acide 5-formylfuroïque. Ces méthodes colorimétriques sont applicables aux oses réducteurs ou non-réducteurs. Un exemple est la quantification de la quantité d'oses totaux par la méthode de Dubois *et al.* (1956) qui utilise du phénol. Son avantage est qu'il est plus sensible à la détermination quantitative des oses que des chromogènes tels que le naphthol ou l'anthrone. En effet, l'anthrone est capable de détecter tous les oses mais, en raison de la grande différence entre les coefficients d'absorption parmi les différents oses, des erreurs peuvent se produire selon la nature du mélange d'oses (Ashwell, 1957).

Enfin, les acides uroniques peuvent être quantifiés par des méthodes colorimétriques spécifiques. Les chromophores sélectifs les plus souvent utilisés sont le méta-hydroxydiphényl en présence de tétraborate de sodium, et le carbazole dans l'acide sulfurique. Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques peuvent être déterminées par la méthode de correction développée par Montreuil *et al.* (1963). Il est alors possible de corriger les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses totaux et réciproquement.

3.1.3. Analyse de la composition en monosaccharides par chromatographie

Après l'hydrolyse du polymère, on procède à la détermination de sa composition osidique. Les monosaccharides libérés sont analysés par HPLC et/ou par CPG en utilisant diverses procédures de dérivation.

3.1.3.1. Méthodes de dérivation des oses pour l'analyse par CPG

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique d'analyse rapide qui, du fait de sa grande sensibilité et de sa capacité à séparer des mélanges complexes, permet d'apprécier qualitativement et quantitativement la composition de différents extraits d'EPS. Les monosaccharides n'étant pas volatils, pour leur analyse en CPG, ils doivent être modifiés afin de les rendre volatils. Pour cela, les techniques de dérivation

sont nombreuses (Tableau 5). Les méthodes les plus courantes sont la pertriméthylsilylation des monosaccharides (ou de leur méthylglycosides) et la réduction des monosaccharides en alditols par le borohydrure de sodium, suivie de leur acétylation par l'anhydride acétique en présence de N-méthylimidazole. Les dérivés aldonitriles acétates et trifluoroacétates ont également été couramment décrits, et les méthylloximes acétates sont parfois employés. Les produits volatils obtenus sont ensuite séparés sur des colonnes capillaires, puis détectés par un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les phases stationnaires utilisées pour la séparation des dérivés glucidiques sont apolaires et greffées par des dérivés siloxanes.

Tableau 5 : Méthodes de dérivation des monosaccharides

Méthodes de dérivation	Dérivés
Pertriméthylsilylation	TMS
Acétylation	acétates
Trifluoroacétylation	trifluoroacétates
Réduction/acétylation	alditols acétates
Oximation/acétylation	aldonitriles acétates
O-méthylloximation/acétylation ou triméthylsilylation	O-méthylloxime acétates ou O-méthylloxime TMS

En fonction de la méthode d'analyse utilisée, les monosaccharides sortiront sur un chromatogramme sous la forme d'un ou de plusieurs pics. En effet, en solution, les oses existent en équilibre dynamique entre leurs formes cycliques et ouvertes. Lors de l'équilibre mutarotationnel, deux anomères α et β peuvent être formés pour chacune des formes furanose et pyranose. Ainsi, jusqu'à quatre isomères peuvent être observés pour un seul monosaccharide (Fig. 4).

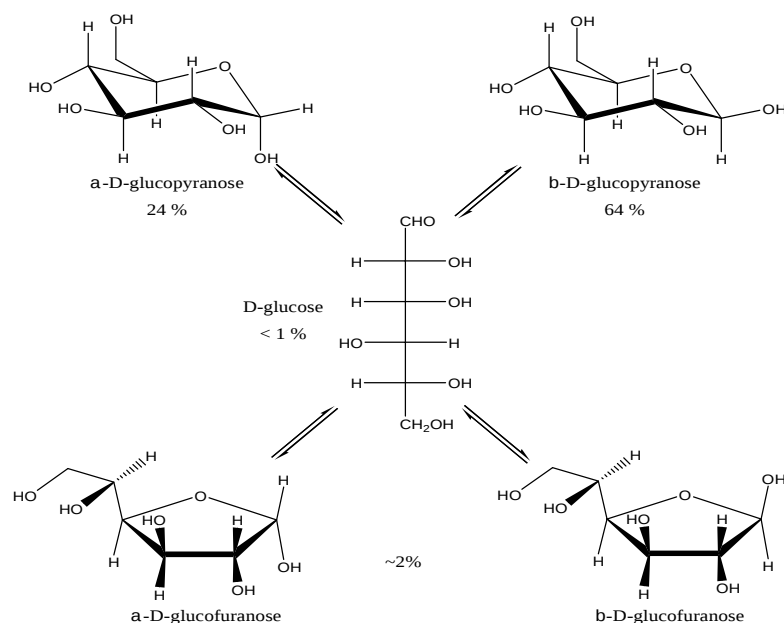


Figure 4 : Équilibre mutarotationnel du glucose

La méthode des acétates d'alditol nécessite la réduction préalable des monosaccharides par le borohydrure de sodium, puis leur acétylation en présence d'anhydride acétique dans de la pyridine (Fig. 5) (Michalski, 1986).

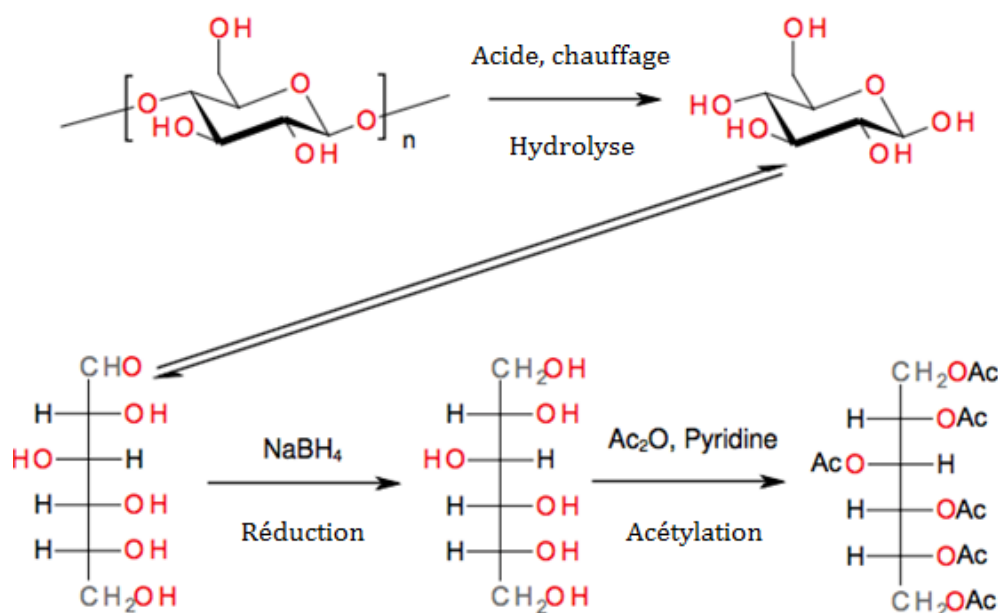


Figure 5 : Méthode de préparation des acétates d'alditol

Cette méthode est très souvent employée du fait de la stabilité des composés formés et de leur bonne résolution chromatographique. Dans ce cas, chaque monosaccharide modifié est identifié sous la forme d'un pic. Elle présente également l'avantage de permettre une identification simultanée des hexoses, déoxyhexoses, pentoses, acides uroniques et osamines. Contrairement à la silylation d'un *O*-méthylglycoside qui conduira à la formation de plusieurs isomères.

Les intensités relatives des pics dans un chromatogramme donnent une information approximative sur le nombre de résidus osidiques dans le motif répété. Un erreur de 10 à 25 % doit être prise en compte dans les ratios molaires obtenus à partir de l'analyse des monosaccharides (Jiménez-Barbero *et al.*, 2003).

Un moyen de déterminer la configuration absolue (D ou L) des résidus d'oses est d'utiliser un alcool optiquement actif pour faire des dérivés (Gerwig *et al.*, 1978 ; Leontin *et al.*, 1978). Cette méthode requiert des standards D et L pour chaque type d'ose. La conséquence est que la configuration absolue d'un ose rare sera difficile à confirmer avec cette méthode.

3.1.3.2. Analyse par HPLC

La méthode alternative à la CPG pour l'analyse de la composition monosaccharidique des EPS est la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). L'HPLC possède certains avantages mais aussi quelques inconvénients par rapport à la CPG. Un grand atout de cette technique est le fait qu'elle est plus rapide et n'exige pas d'étape de dérivatisation de l'échantillon. Un autre avantage est que, à la différence de la CPG, l'HPLC peut être appliquée sur des mélanges complexes de mono- et d'oligosaccharides, permet de détecter des glucosamines et des acides uroniques. Néanmoins l'HPLC possède un pouvoir de séparation inférieur par rapport à celui de la CPG, car cette

dernière permet la détection de plusieurs oses, mêmes de leurs énantiomères, avec des temps de rétention relativement courts.

L'analyse par HPLC s'effectue généralement sur un mélange obtenu après une hydrolyse acide totale de l'EPS. L'identification se fait en fonction du temps de rétention des monosaccharides, par comparaison avec un mélange connu de différents monomères. Les monomères peuvent être identifiés de plusieurs manières. La distinction se fait par rapport aux colonnes et aux techniques de détection utilisées, sans oublier le choix de la phase mobile qui influence fortement la sélectivité de la séparation, ainsi que la durée de l'analyse.

La colonne représente la phase stationnaire de la chromatographie liquide. Le choix du type de colonne s'effectue en fonction du type de détecteur et de l'éluent. Par exemple les colonnes utilisées le plus souvent pour des oses non transformés en dérivés sont des colonnes d'amino- ou cyano-silice greffée, les résines d'échange de cations et des phases stationnaires hydrophiles (HILIC). Les colonnes d'amino-silice greffée sont souvent citées dans la littérature et utilisées avec les détecteurs HPLC de type ELSD (Sharma *et al.*, 2010 ; Bhandari *et al.*, 2008 ; Barreira *et al.*, 2009). Les colonnes normales basées sur silice C8 et C18 sont le plus souvent utilisées pour la séparation des oses transformés en dérivés avec des détecteurs UV-Visible ou en fluorescence (Lv *et al.*, 2009 ; Gomis *et al.*, 2001 ; Racaityte *et al.*, 2005). Pour la séparation des oses par chromatographie d'échange d'ions, on utilise des colonnes contenant un copolymère de divinyl-benzène-styrène hydrogène sulfoné (colonnes PA) (Liu *et al.*, 2012 ; Castellari *et al.*, 2000). Le choix de colonne PA dépend du type d'oses qu'il faut séparer (mono-, disaccharide etc...) et de la résolution dont on a besoin pour la matrice d'échantillon spécifique.

Les différentes techniques de détection utilisées en HPLC sont décrites dans le Tableau 6. Il existe également d'autres méthodes, comme par exemple l'HPLC couplée à la FTIR (Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier), mais elles sont peu décrites et peu utilisées. La méthode de détection UV-Vis qui est souvent utilisée en HPLC ne convient pas pour les oses, car ces derniers ne possèdent pas de chromophore et une dérivatisation est nécessaire. Les techniques de détection comme ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), RI (Refractive Index detection) et MS (Mass Spectrometry) peuvent être utilisées, mais chaque détecteur a ses propres limitations. La chromatographie à haute performance échangeuse d'ions avec une détection ampérométrique pulsée (HAPAEC-PAD) reste la méthode, parmi les chromatographies en phase liquide, la plus sensible et la plus spécifique (Cataldi *et al.*, 2000).

Tableau 6 : Différentes configurations d'HPLC utilisées pour la détection de mélanges de monosaccharides (Goeij et Kok, 2013)

Détecteurs	Mécanisme	Avantages	Inconvénients
UV-Vis	Mesure les composés qui montrent un spectre d'absorption dans la région ultraviolet ou visible.	Les limites de la détection sont de l'ordre de nanogramme (quantité inférieure en comparant avec RI et ELSD)	La détection est empêchée par le manque de chromophores dans la structure des monosaccharides . Il est nécessaire de les transformer en dérivés.
Fluorescence	Certains composés absorbent la lumière à une longueur d'onde (celle d'excitation) et émet à une autre (celle d'émission).	Haute sensibilité et sélectivité (ne détecte pas les impuretés)	Les monosaccharides n'ont pas de fluorophores. Il est nécessaire de les dériver.
RI (Indice de réfraction)	Basée sur la réfraction de la lumière par les composés dans une solution. Il est possible d'utiliser une colonne chirale qui permet l'identification et la détermination de la configuration absolue (D ou L) et simultanément de la configuration du centre anomérique (α ou β) (Lopes et Gaspar, 2008)	Tous les composés dans l'éluant peuvent être détectés, donc convenable pour les monosaccharides.	Sensibilité à la température - les petites fluctuations résultent en grandes variations. Faible sensibilité de détection. Incompatible avec l'élution en gradient.
ELSD (Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière)	Universelle et non spécifique, elle détecte tous les solutés non volatiles après l'évaporation du solvant de la colonne par une dispersion de la lumière sur les particules solides formées. L'intensité du signal est liée à la concentration de l'analyte dans l'effluent.	Détection des composés non-chromophores et non-volatiles, donc convenable pour la détection des sucres. Permet une élution en gradient.	Faible reproductibilité, moins sensible pour des composés de faible poids moléculaire, non-linaire.
CAD (Détection en aérosol chargé)	Basée sur la détection des particules dispersées comme dans l'ELSD.	Universelle, dépend de la masse, plus sensible par rapport à ELSD	La forme de pics est de moindre qualité, la reproductibilité est plus faible par rapport à la détection UV

Détecteurs	Mécanisme	Avantages	Inconvénients
MS (Spectrométrie de masse)	Ionise des composés chimiques afin de produire des molécules chargées ou des fragments de molécule. Les ions sont détectés. Le signal est traité dans un spectre d'abondance relative des ions comme fonction du rapport "masse sur charge".	L'information de MS indique la structure chimique.	Faible efficacité d'ionisation des monosaccharides dans un mode négatif à cause de leur faible acidité.
HPAEC-PAD	Les groupes -OH du carbone anomérique peuvent être déprotonés à pH alcalin (entre 12 et 14) et ainsi possèdent une forte charge négative. Une interaction entre cette charge négative de la molécule de sucre et la charge positive d'ion métallique sur la surface de la résine est la cause de la rétention et de la séparation des monosaccharides . La détection est réalisée par ampérométrie en mesurant le courant résultant de l'oxydation ou de la réduction de la molécule d'échantillon sur une électrode d'or ou d'argent.	Souvent utilisée pour la séparation des monosaccharides . Seuil de détection des monosaccharides : à partir de 10 pmol par injection. Haute résolution et séparation très sélective des monosaccharides (Davidek <i>et al.</i> , 2003). Permet une élution en gradient.	

3.2. Analyse structurale

Après la détermination de la composition monosaccharidique d'un EPS, l'étape suivante est la détermination de la séquence des monosaccharides dans l'unité répétée et le type de liaison entre eux. Plusieurs techniques peuvent contribuer à cette analyse structurale : la méthylation et l'analyse par CPG, FTIR, RMN, et la spectrométrie de masse. La méthode la plus fiable et la plus souvent utilisée est l'analyse par RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire), sachant que le couplage des données de RMN avec celles provenant d'autres analyses peut permettre de confirmer les résultats.

3.2.1. Détermination de la nature des liaisons osidiques par méthylation

L'étude de la méthylation d'oligosaccharides ou de polysaccharides par CPG/spectrométrie de masse (CPG-MS) permet de déduire l'enchaînement des unités osidiques et leurs points de branchements (Hakomori, 1964). Cette méthode consiste en une méthylation complète des groupes hydroxyles libres du polysaccharide (Fig. 6). Dans un premier temps, en présence d'une base forte (sodium méthylsulfinylméthanide), se forme des alcoolates qui sont ensuite méthylés avec l'iodure de méthyle dans le DMSO. Pendant cette réaction, les liaisons glycosidiques ne sont pas rompues car elles sont stables dans les conditions basiques nécessaires pour l'alkylation. Les polysaccharides ainsi méthylés sont ensuite hydrolysés en formant des groupes hydroxyles sur les liaisons glycosidiques. Cela permet d'identifier les positions des liaisons glycosidiques dans le polysaccharide. Les monosaccharides méthylés sont ensuite réduits par du NaBD₄ (tétrahydruroborate de sodium deutérée), afin de pouvoir différencier les C-1 des C-6, puisque seule la fonction réductrice est porteuse d'un deutérium. Les alditols partiellement méthylés sont acétylés, ce qui conduit à la formation d'acétates d'alditol, suffisamment volatils pour être analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Le mélange d'acétates d'alditol obtenu est analysé avec un couplage CPG/MS. Le chromatogramme obtenu permet de distinguer le nombre d'oses neutres différant par leur nature ou par la position de substitution. Pour chaque pic, on obtient le spectre de masse correspondant, que l'on compare à une bibliothèque de spectres prenant en compte le temps de rétention relatif calculé par rapport à une référence, l'inositol peracétylé avec : $T_{\text{relatif}} = (t_{R,\text{produit}} / t_{R,\text{inositol}}) \times 1000$ (Roman, 1997). Cela fournit la nature de l'acétate d'alditol, ce qui permet d'en déduire le type de liaisons entre les unités dans le polymère. Une complication possible est que les pyranoses substitués en position 4 donnent le même dérivé que les furanoses substitués en position 5. L'analyse par RMN est nécessaire pour les distinguer.

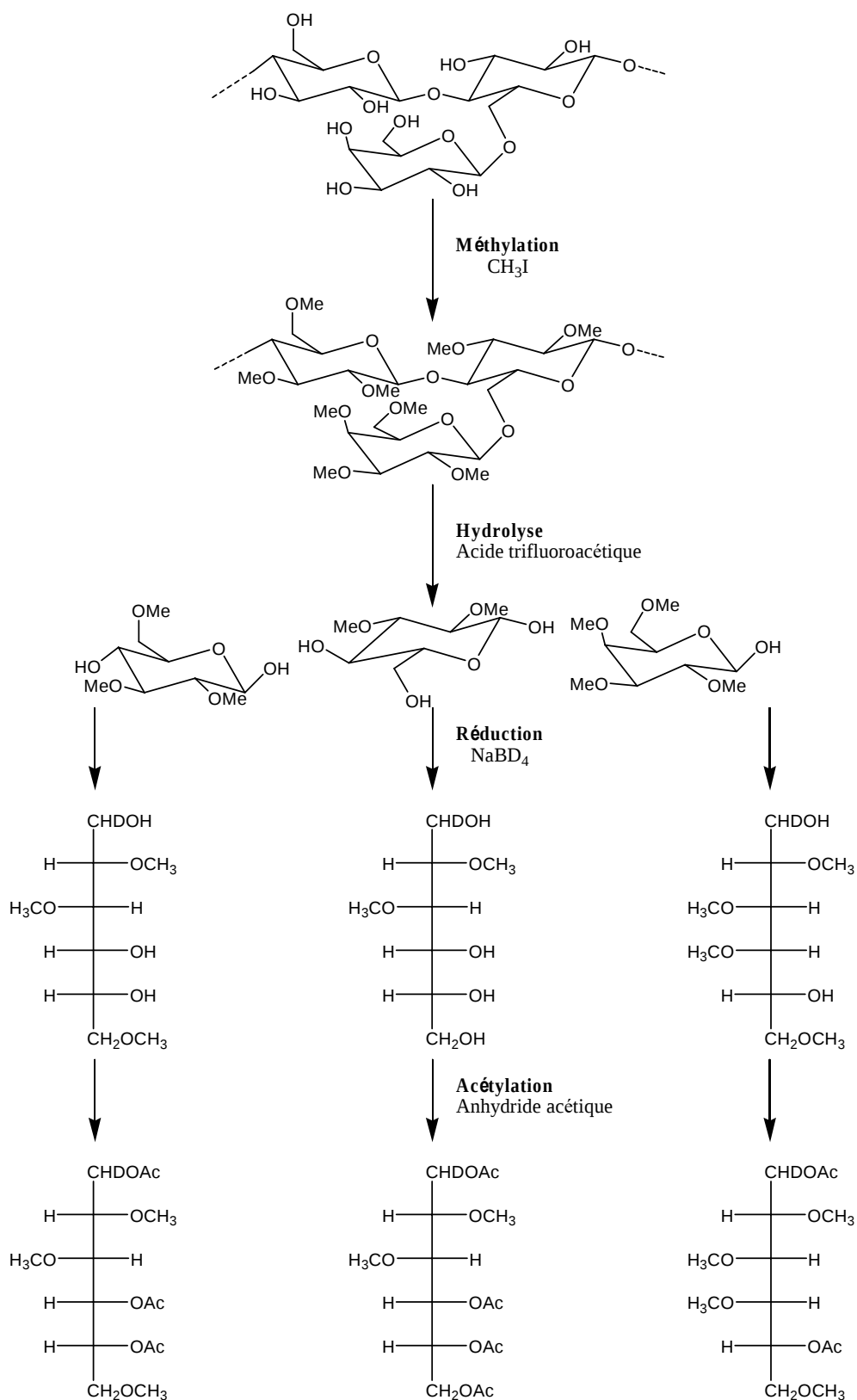


Figure 6 : Étude de l'enchaînement de monosaccharides par méthylation et une analyse par CPG

3.2.2. Analyse infrarouge

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu de quantité de polymère à analyser. Elle peut être employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés. Basée sur le fait que les molécules absorbent à des longueurs d'onde spécifiques qui sont caractéristiques de leur structure, elle exploite les transitions correspondant à des états vibrationnels et rotationnels de la liaison ou du groupe qui vibre. Les molécules complexes comme les polysaccharides possèdent un grand nombre de types de vibrations. Certaines sont localisées tandis que d'autres sont considérées comme des vibrations de toute la molécule (Williams et Fleming, 1995). La région entre 4000-1500 cm^{-1} dans le spectre IR moyen est désignée comme la région des groupes fonctionnels. Les bandes dans cette région sont des liaisons individuelles ou des groupes fonctionnels des molécules. La plupart du temps, ces bandes donnent une information supplémentaire de la région spectrale en dessous de 1500 cm^{-1} , appelée région "d'empreintes digitales". Les bandes entre 1500-400 cm^{-1} sont souvent utilisées pour confirmer l'identité du composé. Ainsi certains groupements ou liaisons, considérés comme marqueurs (*e.g.* sulfates ou liaison 3→6-anhydro), peuvent révéler la présence de certaines catégories de polysaccharides (agar, carraghénane) (Chopin *et al.*, 1999).

3.2.3. Analyse par RMN

La spectroscopie par RMN est une méthode d'analyse basée sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Quand un champ magnétique externe est appliqué à une molécule, les noyaux passent d'un niveau fondamental à un niveau excité, c'est le phénomène de résonance magnétique. Cette technique puissante est applicable aux polysaccharides qui donnent des systèmes d'excitation "isolés" car la magnétisation doit être transférée par la liaison glycosidique reliant deux monosaccharides. Une étude par RMN séquentielle permet de confirmer les premières analyses effectuées à l'aide d'autres techniques et de faire une attribution complète des signaux "proton" et "carbone" pour obtenir ensuite la structure de l'EPS. Ainsi la RMN est devenue une analyse de routine pour l'étude de la structure des EPS. Son avantage est d'être une méthode physico-chimique non-destructive permettant, à partir de quelques micromoles de polysaccharide, de réaliser le dosage et l'identification de chacun des monosaccharides, d'en préciser l'enchaînement, leurs points de branchement et leurs anomères (Strecker, 1993 ; Strecker, 1995). Le fait que la RMN soit une méthode non destructive permet de récupérer le polysaccharide dans son état initial pour d'autres études, après élimination du solvant.

L'étude structurale par RMN comprend souvent un spectre proton ^1H , un spectre carbone ^{13}C et des cartes de corrélation à deux dimensions, si l'échantillon est suffisamment concentré. L'interprétation du spectre RMN des mono- et oligosaccharides nécessite d'avoir accès à une base de données de spectres RMN de référence. L'attribution des spectres est facilitée par la disponibilité de bases de données et de programmes de prédictions des déplacements chimiques tels que Glycoscience.de, <http://www.glycosciences.de/sweetdb/> (Lütteke *et al.*, 2006) et Casper <http://www.casper.organ.su.se/casper/> (Jansson *et al.*, 2006 ; Lundborg et Widmalm, 2011). Des bases de données supplémentaires sont résumées dans deux articles de synthèse (Berteau et Stenutz, 2004 ; Marchal *et al.*, 2003). L'analyse par RMN peut être conduite selon deux directions. Si les déplacements chimiques des protons de la molécule isolée correspondent à ceux déjà décrits, alors l'analyse est terminée. Cette

technique nommée "finger-print" a été développée par Vliegenthart *et al.* (1983) pour la caractérisation des glycanes des glycoprotéines. Si, au contraire, la comparaison des déplacements chimiques (δ) avec la base de données ne permet pas d'identifier les monosaccharides, leurs substitutions et/ou leurs liaisons, il faut alors déployer l'analyse RMN avec des séquences bidimensionnelles.

Le spectre RMN monodimensionnel du proton donne des informations primaires sur la valeur des déplacements chimiques des protons identifiables et permet de les comparer avec ceux déjà décrits dans les bases de données. Dans une molécule, les protons ont des environnements chimiques différents, et auront donc différentes fréquences de résonance. Ainsi de ^2H au travers ^6H résonne à 3,5 - 4,5 ppm, tandis que le ^1H anomérique se trouve entre 4,5 - 5,8 ppm. Pour les pyranoses l'équatorial ^1H est généralement déblindé de l'axial ^1H . Pour les monosaccharides, le ^1H d'un OH anomérique en position α (qui a un H équatorial) résonne à 5,3 - 5,8 ppm, tandis que l'homologue β (qui a un axial H) résonne à 4,5 - 4,8 ppm. De cette façon le spectre RMN monodimensionnel du proton renseigne également sur le nombre de résidus monosaccharidiques par l'intégration des protons anomériques. Si des substituants de l'oxygène sont présents dans l'EPS, ils déplacent le proton voisin et le plus souvent ce déplacement est déblindé.

Outre que les déplacements chimiques, les constantes de couplage "carbone-proton" ($^n\text{J}_{\text{C,H}}$) et "proton-proton" ($^n\text{J}_{\text{H,H}}$) (n étant le nombre de liaisons séparant les deux atomes) sont également informatives (Vliegenthart, 2006; Bubb, 2003; Bush, 1966; Bush *et al.*, 1999; Duus *et al.*, 2000). Leur mesure discrimine l'anométrie α ou β de dérivés pyranoses ou furanoses. Ainsi il est établi que $^1\text{J}_{\text{C1,Heq}}$ est supérieur à $^1\text{J}_{\text{C1,Hax}}$ avec une différence de l'ordre de 10 Hz. Pour les pyranoses, $^1\text{J}_{\text{C1,Heq}}$ qui correspond à l'anométrie α est environ de 170 Hz, et $^1\text{J}_{\text{C1,Hax}}$, qui correspond à l'anomère β , vaut environ 160 Hz (Tvaroska et Taravel, 1995). Pour les furanoses, les valeurs de $^1\text{J}_{\text{C1,H1}}$ sont plus élevées, de l'ordre de 180 Hz pour l'anomère α et 175 Hz pour l'anomère β (Cyr et Perlin, 1979). Il est possible également de déterminer la forme anomère d'un ose grâce à la constante de couplage entre le proton H_1 du cycle et le proton H_2 du même cycle ($^3\text{J}_{\text{H1,H2}}$). Cette constante dépend de l'angle de torsion entre les atomes couplés, en particulier de l'orientation des protons (Tvaroska et Taravel, 1995). C'est pourquoi les valeurs observées sont très différentes pour les pyranoses et les furanoses. Pour les protons "axial/axial", la valeur de $^3\text{J}_{\text{H1,H2}}$ est égale à 7-8 Hz. Pour les protons "axial/équatorial" ou "équatorial/équatorial", la valeur de $^3\text{J}_{\text{H1,H2}}$ est égale 3-4 Hz. Dans le cas du glucose et du galactose, l'angle dièdre entre les deux protons pour la forme β de pyranose est de 180° , ce qui entraîne une constante de couplage assez grande $^3\text{J}_{\text{H1,H2}} = 7-8$ Hz, alors que l'angle dièdre formé par les $\text{H}_1 \alpha$ et $\text{H}_2 \alpha$ est de 60° d'où une constante plus petite, $^3\text{J}_{\text{H1,H2}} = 3-4$ Hz (Roman, 1997). Pour la forme β de furanoses, $^3\text{J}_{\text{H1,H2}}$ est inférieure à 2 Hz avec un angle dièdre compris entre 100° et 120° . Pour la forme α de furanoses, $^3\text{J}_{\text{H1,H2}}$ est supérieur à 4 Hz et l'angle se situe entre 25° et 35° (Alföldi *et al.*, 1972). Les couplages entre les protons H_3 et H_4 d'une part, et H_4 et H_5 d'autre part, peuvent être également assez informatifs, car très différents pour un galactopyranose et un glucopyranose (qu'ils soient α ou β).

En pratique, le spectre RMN ^1H a tendance à générer des lignes qui se chevauchent dans la région 3,0-4,5 ppm et en plus peut manifester un élargissement des lignes (notamment pour des polysaccharides ayant une masse moléculaire élevée). Le spectre ^{13}C a une dispersion du déplacement chimique plus large et peut souvent fournir plus d'informations. Pour obtenir un bon spectre ^{13}C , les échantillons doivent être

concentrés, car la sensibilité est inférieure, en raison de l'abondance naturelle du ^{13}C (1,1%) et au ratio gyromagnétique des noyaux ^{13}C . Dans un spectre ^{13}C simple comme dans un spectre ^{13}C DEPT, deux régions sont importantes. De 90 à 115 ppm, se trouve la région des carbones anomériques C_1 . Le déplacement chimique des C_1 dépend également de la configuration α ou β et de la forme du cycle (pyranose et furanose). De 60 à 90 ppm (dans le cas où il n'y a pas de substituants), correspond à la région où se situent tous les autres carbones des cycles. De plus, il est établi que les carbones C_6 se situent dans une zone entre 60 et 70 ppm. Ils ont des déplacements chimiques différents selon qu'ils sont libres ($-\text{CH}_2\text{OH}$) ou liés à un autre cycle ($-\text{CH}_2\text{O}-$). Les C_6 liés sont plus déblindés que les libres ce qui permet de les distinguer. Les C_6 peuvent être différenciés des autres carbones, car ils portent deux hydrogènes alors que les autres n'en portent qu'un. L'expérience DEPT avec un angle de 135° permet de séparer les CH_2 (les C_6) en les plaçant vers le bas (sous la ligne de base) des CH qui sont vers le haut.

L'élucidation des structures glycosidiques résulte ensuite de l'utilisation des méthodes RMN bidimensionnelles et tridimensionnelles. Un temps de transfert plus long permet à la magnétisation de passer à travers le système d'excitation et ainsi de donner plus de corrélations. Les expériences les plus fréquemment utilisées sont décrites dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Liste des corrélations RMN utilisées dans l'étude de la structure des EPS

COSY ¹	Permet de mesurer toutes les constantes de couplage entre les différents protons adjacents qui résonnent dans la "bulk region" entre 3,2 et 4 ppm. Il existe également plusieurs versions de COSY modifiées.
TOCSY	Permet le transfert de la magnétisation sur tous les protons d'un monosaccharide. Ainsi les corrélations sont faites également parmi les protons éloignés du monosaccharide.
HETCOR, HMQC, HSQC	Permet de corréler chaque proton avec le carbone auquel il est lié.
HMBC, COLOC	Donne les couplages $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ et les constantes ^3J associées. Il est alors possible de corréler les noyaux distants de 3 liaisons covalentes, notamment les constantes $^3\text{J}_{\text{H}1-\text{C}_x}$ où x est la position du carbone du monosaccharide voisin inclus dans la liaison glycosidique. Ainsi, on peut préciser l'enchaînement des monosaccharides et donc, la séquence de l'oligosaccharide.
NOESY	Fournit généralement des pics de corrélation intenses entre les protons $\text{H}1$ et H_x de deux oses reliés par une liaison $1 \rightarrow x$. Peut également préciser l'enchaînement des monosaccharides.
ROESY	Similaire au NOESY, mais réalisé en référentiel tournant. Particulièrement utile pour des molécules avec une taille moyenne de 1000 à 3000 Da.
INADEQUATE	Donne les couplages C-C et donc les corrélations $^1\text{J}_{\text{C}-\text{C}}$ dans un monosaccharide. Méthode la plus puissante pour la détermination de la structure, malgré l'inconvénient de sa faible sensibilité.
DOSY	Donne les couplages des déplacements chimiques avec les constantes d'autodiffusion. L'expérience permet souvent la différenciation des molécules par leur taille, mobilité, liaisons ou agrégation.

¹Les acronymes de cette colonne sont expliqués dans la Section "Abréviations"

3.2.4. Analyse par spectroscopie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse avec des limites de détection basses. Ses applications sont variées et permettent maintenant l'analyse de macromolécules. Cette détection requiert l'ionisation préalable en phase gazeuse des molécules analysées. La mesure des rapports masse/charge (m/z) des ions moléculaires ou des fragments ainsi générés permet de déterminer la masse moléculaire des composés étudiés et ainsi de collecter des informations structurales. De plus, la précision et la sensibilité de cet outil permet de mesurer des masses avec une précision de 1 Da pour 20 000 Da dans le domaine des zeptomoles (10^{-21} moles).

Pour les analyses en MS, les polysaccharides doivent être réduits en oligosaccharides par hydrolyse acide ou par dégradation enzymatique. Les digestions enzymatiques peuvent faciliter l'étude de la structure, sachant qu'elles ont une spécificité de clivage des liaisons. À partir des oligosaccharides générés, une information importante sur la nature des monosaccharides, des ramifications, et éventuellement des modes de liaisons peut être déterminée grâce à la fragmentation. Cette fragmentation est nommée "Dissociation Induite par Collision" (CID) des oligosaccharides. La nomenclature utilisée en MS pour la CID des oligosaccharides est montrée dans la Figure 7. Les fragments ionisés qui contiennent la partie non-réductrice sont notés avec les lettres majuscules du début de l'alphabet (A, B, C), et ceux qui contiennent l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide sont notés avec des lettres de la fin de l'alphabet (X, Y, Z). Les ions produits à partir de la rupture des résidus successifs sont marqués : A_m , B_m , et C_m , pour l'extrémité non-réductrice et le X_n , Y_n , et Z_n , pour l'extrémité réductrice. Les ions de type A et X sont produits par la rupture intracyclique, et sont notés en indiquant les liaisons impliquées dans la coupure en partant de la liaison hémicétal intracyclique (0) et en augmentant l'indice dans le sens des aiguilles d'une montre. La figure 7 montre l'exemple de deux fragments ionisés obtenus par ce type de coupure ($^{0,2}A_1$ et $^{1,5}X_1$) (Bauer, 2012).

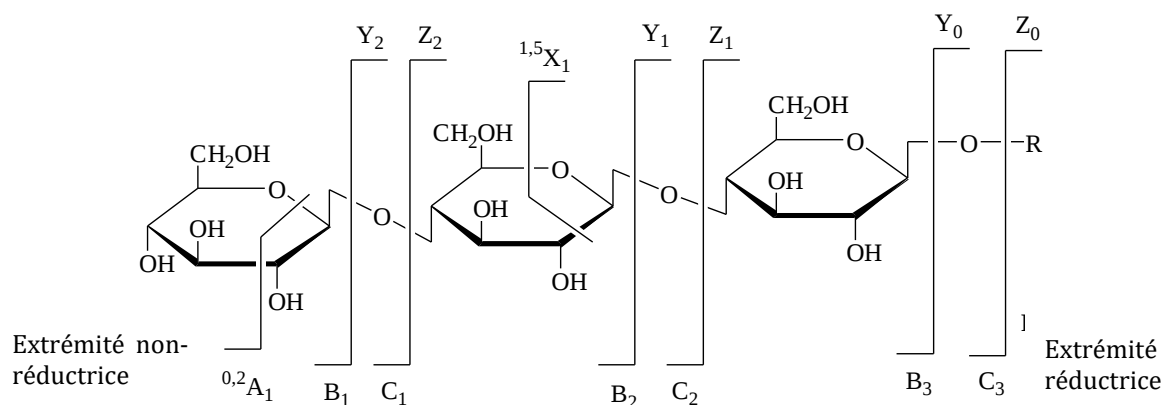


Figure 7: Nomenclature systématique pour les fragmentations d'oligosaccharides générés par MS en tandem (Bauer, 2012)

Dans le cadre de ma thèse, c'est la technique de FTICR-MS qui a été utilisée. C'est une technique utilisant un piège magnétique (Marshall, 2000). Les ions sont confinés dans le piège par la combinaison d'un champ magnétique et d'un champ électrostatique. Le piège peut être utilisé à la fois comme chambre de réaction et comme analyseur en masse. En présence d'un champ magnétique, les ions ont un mouvement de rotation appelé mouvement "cyclotron" dont la fréquence est caractéristique de leur rapport

"masse sur charge" (m/z). Le principe de la détection consiste à mesurer ces fréquences. Ensuite, après transformation de Fourier, on obtient un spectre en fréquence auquel il faut appliquer une loi de calibration pour passer du spectre en fréquence au spectre de masse. La FTICR-MS présente plusieurs avantages par rapport aux autres techniques de MS. Elle permet d'obtenir une résolution en masse très élevée, ce qui permet d'éviter les interférences entre les composés de même masse nominale. La détermination des masses absolues se fait avec une grande précision et rend possible la mesure des masses exactes des molécules. Ces résultats sont souvent essentiels pour l'identification de composés inconnus.

4. Propriétés rhéologiques des EPS

La caractérisation rhéologique est essentielle pour évaluer l'utilisation potentielle d'un polysaccharide extrait et maintenu dans son état initial ou modifié par la suite (*e.g.* déacétylation). L'intérêt industriel des polysaccharides réside dans leurs propriétés rhéologiques comme des agents épaississants ou gélifiants. Ces propriétés sont déterminées par les quatre niveaux d'organisation des PS qui sont la structure primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire. La séquence covalente des unités monomériques du squelette de la chaîne polysaccharidique représente sa structure primaire. Sa connaissance est essentielle pour la compréhension de la conformation tridimensionnelle des PS dans un état solide et en solution. La chaîne polysaccharidique isolée peut adopter certaines formes qui lui confèrent sa structure secondaire. En passant à plus grande échelle d'organisation, les interactions énergétiquement favorables entre les chaînes ayant des structures secondaires résultent en structures spécifiques ordonnées constituant la structure tertiaire. Par exemple, les conformations en "ruban" et en "hélice" de la structure secondaire des polysaccharides s'organisent en arrangements complexes, comme en agrégats d'hélices ou de rubans qui représentent des structures tertiaires. Ces entités compactes peuvent interagir entre elles pour donner un niveau d'organisation encore plus élevé, c'est-à-dire en structure quaternaire (Lapasin et Pricl, 1995).

Tenir compte de ces différents niveaux d'organisation permet de comprendre que les liaisons entre les résidus osidiques, et la présence de ramifications, de groupes fonctionnels, de groupes ionisables ou de sucres modifiés, ainsi que la longueur en solution, la forme et la rigidité de la chaîne jouent un rôle important pour déterminer les propriétés macroscopiques du polymère, y compris sa rhéologie. Beaucoup de ces paramètres se corrèlent entre eux, par exemple la rigidité de la chaîne avec sa longueur. D'autres paramètres doivent être combinés avec des facteurs extérieurs, comme par exemple les caractéristiques du solvant permettant la solubilisation du polymère. Les changements de la force ionique, de la nature des contre-ions, de la température ou d'autres paramètres du solvant peuvent conduire à une transition conformationnelle, modifiant ainsi la résistance hydrodynamique de l'écoulement de la molécule. Si la concentration du polymère est élevée, ces variations peuvent favoriser des changements structuraux au niveau supermoléculaire, avec des conséquences sur le comportement rhéologique. Ainsi les liaisons non-covalentes formées entre les chaînes polysaccharidiques peuvent aboutir à la formation d'un réseau tridimensionnel, autrement dit à un gel si les liaisons sont stables, ou à un polymère visqueux si les liaisons sont transitoires (Fig. 8). Ces changements dans la rhéologie du milieu par les polysaccharides sont liés à leurs propriétés épaississantes ou gélifiantes (Fig. 8).

Pour réaliser son analyse rhéologique, le polysaccharide doit être solubilisé. La

solubilisation permet l'individualisation des macromolécules avant que celles-ci ne s'associent pour modifier la texture de la phase aqueuse (Fig. 8). La solubilité dépend du degré de branchement de la molécule, de la présence de substituants ioniques sur les monomères constituant le polysaccharide et de la présence d'oses modifiés. Plus les branchements sont nombreux et répartis régulièrement, plus la solubilité augmente. C'est le cas du xanthane qui est décrit comme un dérivé soluble de la cellulose dû à son squelette de cellobiose sur lequel se fixent des chaînes latérales (Kumar *et al.*, 2007). De même, une meilleure hydratation est observée lorsque le polysaccharide contient des substituants ioniques. Par exemple la plupart des EPS sont anioniques et manifestent une haute affinité pour certains ions métalliques (Mittleman et Geesey, 1985). Cela est dû à la présence d'acides uroniques dans leur structure, procurant des charges négatives et des propriétés acides. Ceux-ci favorisent l'écartement des chaînes par des répulsions électrostatiques et/ou un encombrement stérique, ce qui augmente les interactions entre le soluté et le solvant.

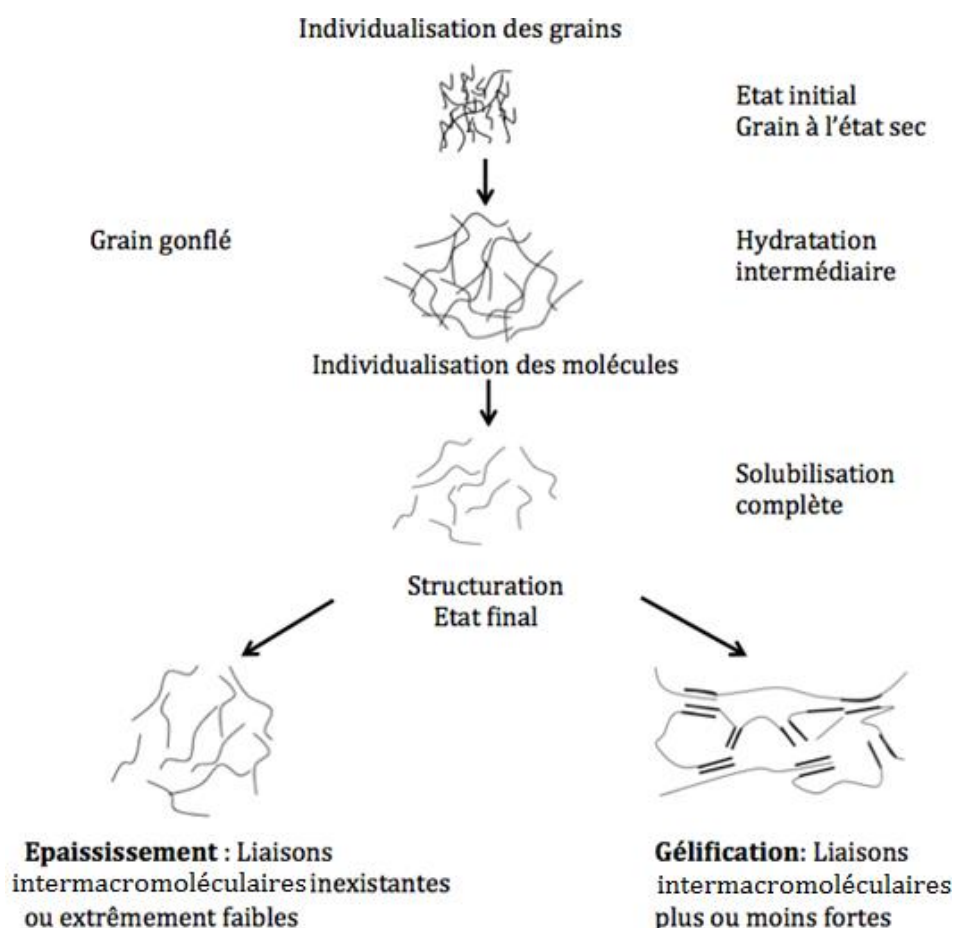


Figure 8 : Structuration de la phase aqueuse en présence de polysaccharide

Enfin les polysaccharides, même hydratés dans de l'eau, peuvent être amorphes ou même insolubles. Le squelette rigide d'un polysaccharide est dû à des liaisons de type β (1→4) ou β (1→3). Par contre la présence de liaisons de type α (1→2) ou α (1→6) donne plus de flexibilité aux polymères (Sutherland, 2001a ; Poli *et al.*, 2010). Deux exemples : le xanthane, qui possède des liaisons β (1→4) dans la chaîne principale et qui a un fort pouvoir épaississant, est utilisé comme additif alimentaire ; le dextrane, dont le

squelette est fait d'enchaînements α (1 $\rightarrow$ 6) avec des ramifications en (1 $\rightarrow$ 2), (1 $\rightarrow$ 3) ou (1 $\rightarrow$ 4), est utilisé, entre autres, pour la fabrication de "larmes artificielles".

5. Optimisation des conditions de culture

Les EPS sont des produits secondaires du métabolisme bactérien. Pour augmenter la production d'EPS il faut tout d'abord augmenter la biomasse bactérienne (nombre de bactéries/mL). Par la suite, selon la phase de croissance dans laquelle l'EPS est produit et selon les facteurs qui influencent sa production, une optimisation doit être réalisée pour obtenir le plus de produit possible. En général, les conditions optimales pour la production de biomasse ne sont pas exactement les mêmes que celles pour la production d'EPS (Gorret *et al.*, 2001).

5.1. Optimisation de la croissance bactérienne

Le métabolisme des bactéries est considérablement affecté par les conditions physiques et chimiques de leur milieu de croissance. Les conditions physicochimiques incluent la température, le pH, la force ionique, la disponibilité de l'oxygène et bien évidemment la concentration et la nature des substrats. Une analyse détaillée de tous ces paramètres est nécessaire pour optimiser la croissance bactérienne et son métabolisme secondaire.

5.1.1. Conditions physiques optimales

Les conditions physiques des différents habitats terrestres varient considérablement. Les besoins optimaux entre les différents genres bactériens, issus de ces habitats, excluant parfois même la survie des eucaryotes, sont très divers. Nous présentons ci-après quatre conditions majeures qui peuvent influencer la croissance bactérienne.

5.1.1.1. Température

La température optimale de croissance des bactéries peut varier de façon très importante, traduisant celle qui prévaut dans leur écosystème d'origine. Cette température peut varier légèrement en fonction d'autres facteurs tel que la composition du milieu de culture (Macedo *et al.*, 2002). En effet le métabolisme bactérien s'accélère avec une augmentation de la température et par conséquence la croissance bactérienne est stimulée. Ce phénomène est observé jusqu'à une valeur de température où des réactions métaboliques commencent à être inactivées. À l'inverse, quand la température est trop basse, l'affinité de bactéries pour leur substrat diminue et leur croissance est ralentie (Nedwell *et al.*, 1999).

Selon leur optimum de température, les bactéries peuvent être classées en quatre groupes : psychrophiles, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles. La grande majorité des bactéries appartiennent au groupe de mésophiles qui se développent à des températures entre 20 et 40 °C. C'est le cas en particulier des bactéries du sol, y compris de bactéries isolées dans un milieu semi-désertique comme Rta.

5.1.1.2. pH

Les bactéries ont également un pH optimal de croissance. De façon générale, ce pH optimal se situe entre 5 et 9 (bactéries neutrophiles). Quelques espèces bactériennes sont connues pour avoir un pH optimum de 2 (*Sulfolobus*, *Acidithiobacillus*) ou supérieur à 9 (*Bacillus firmus*), et sont nommées respectivement acidophiles et alcalophiles.

Dans une culture bactérienne en batch le pH peut évoluer pendant la croissance bactérienne, résultat de réactions métaboliques qui produisent des molécules acides ou basiques. Le pH peut influencer négativement la structure des protéines et l'intégralité des membranes. Un excès d'ions d'hydrogène (H^+), abaissant le pH, modifie la structure tridimensionnelle des protéines devenant non-fonctionnelles. Un pH élevé, dû à un excès d'anions hydroxydes (HO^-), a un effet direct sur la solubilité des métaux. L'augmentation du pH des milieux complexes riches en protéines et en peptides, comme par exemple le milieu TSB (Tryptic Soy Broth), est dû souvent à l'utilisation de ces nutriments comme source de carbone par les bactéries. Ainsi elles peuvent libérer de l'ammoniaque à partir des acides aminés car la demande en carbone est beaucoup plus importante par rapport à celle en azote. L'ammoniaque libéré attire des protons dans une solution aqueuse pour former des ions ammonium qui provoquent une augmentation dans le pH. La toxicité des pH extrêmes n'est pas une conséquence directe des concentrations en H^+ et HO^- mais de l'augmentation de la formation d'acides et de bases faibles non-dissociés. Ces acides et bases non-dissociés, pénétrant plus facilement dans la cellule, sont physiologiquement plus actifs et toxiques par rapport aux formes dissociées (VanDemark et Batzing, 1987). C'est la raison pour laquelle des solutions tampons sont ajoutées, en général dans le milieu de culture, pour stabiliser le pH à un point de consigne (pH optimal de croissance). Les tampons agissent généralement sur une plage étroite de pH et par conséquent la composition de tampons varie en fonction du pH optimal ciblé.

5.1.1.3. Effets osmotiques

Le premier facteur limitant la croissance de tous les organismes vivants est l'eau. Sa disponibilité pour les bactéries est un facteur limitant de chacune des quatre phases de leur croissance. La disponibilité en eau ne dépend pas seulement de la quantité d'eau mais également de la nature des molécules en solution. La disponibilité de l'eau est exprimée avec une dimension physique dite "activité de l'eau" (a_w). Les valeurs de cette activité de l'eau varient entre 0 et 1. La plupart des bactéries ont un taux de croissance maximum aux environs d' $a_w = 0,980$ à $0,997$, ensuite il diminue de façon linéaire. (Nedwell *et al.*, 1999 ; Foods, 1980). En général les bactéries à Gram négatif sont plus sensibles à une réduction de l' a_w (croissance minimum $0,94-0,96$) (Sainclivier, 1985). Certaines bactéries dites halophiles ont un optimum de croissance à des concentrations élevées de sels (de 1 à 30 %) (VanDemark et Batzing, 1987). Les bactéries osmophiles sont capables de survivre et de se développer dans des environnements et des milieux ayant des concentrations en sucres élevées. Enfin, les xérophiles sont des bactéries capables de se développer dans des milieux secs (*e.g.* certaines souches d'*Actinobacteria* survivant à une a_w de l'ordre de 0,5).

Au final le problème de la plupart des bactéries est de pouvoir s'adapter à un éventuel stress osmotique. Cela exige que la cellule accumule des composés appelés "solutés compatibles" qui soient à la fois physiologiquement non toxiques et "osmotiquement actifs" pour contrebalancer une pression osmotique trop forte (Miller et Wood, 1996). La production, l'accumulation et le transport des solutés sont énergétiquement coûteux, diminuant ainsi l'absorption des nutriments et la croissance bactérienne et augmentant le métabolisme vers la biosynthèse des solutés nécessaires.

5.1.1.4. Oxygénation

Selon leurs besoins en oxygène, les bactéries peuvent être classées en quatre groupes : bactéries aérobies strictes, aérobies facultatives, microaérophiles et anaérobies. Les aérobies strictes ne se développent pas en absence d'oxygène. Certaines activités enzymatiques des bactéries microaérophiles (nitrogénase, hydrogénase...) sont inactivées par une teneur normale de l'atmosphère en oxygène (21 %) et exigent des teneurs de l'ordre de 2 à 10 %. Les bactéries aérobies facultatives se développent mieux en présence d'oxygène, mais continuent à croître en son absence en utilisant un autre accepteur terminal d'électrons (*e.g.* nitrate). Enfin les bactéries anaérobies ne sont pas capables de tolérer la présence d'oxygène et utilisent donc obligatoirement d'autres accepteurs terminaux d'électrons.

Pour la croissance des bactéries aérobies cultivées en grand volume, l'aération par agitation n'est généralement pas suffisante et nécessite l'injection de bulles d'air stérile dans le milieu.

5.1.2. Milieu de culture optimal

La croissance bactérienne repose sur l'apport de macronutriments (substrats carbonés, azotés...) et de micronutriments (cofacteurs, vitamines...) en quantité suffisante et, si possible, au fur et à mesure de la croissance (*fed-batch*) pour éviter l'apparition de facteur(s) limitant(s).

5.1.2.1. Source de carbone

Dans une cellule bactérienne moyenne, le carbone représente environ 50 % de sa masse sèche ce qui en fait l'élément majeur des besoins nutritifs (VanDemark et Batzing, 1987). Dans les applications industrielles, l'autotrophie pour le carbone n'est utilisée que pour les bactéries photosynthétiques. De façon générale les bactéries, dont on cherche à optimiser la croissance en batch ou en *fed-batch*, sont hétérotrophes pour le C, et les sources de carbone à haute valeur énergétique (glucides, acides organiques) sont privilégiées (Rojo, 2010).

5.1.2.2. Source d'azote

Après le carbone l'élément le plus abondant dans la cellule bactérienne est l'azote. Dans une cellule bactérienne moyenne l'azote représente environ 12 % de sa masse sèche (protéines, acides nucléiques...). Quelques espèces bactériennes sont autotrophes pour N car elles possèdent une nitrogénase, enzyme leur permettant de réduire l'azote atmosphérique (N₂) en ammoniacque. Cette propriété n'est jamais utilisée sur un plan industriel et les sources de N pour les bactéries hétérotrophes (pour N) sont sous forme inorganique (ammonium ou nitrate) ou sous forme organique (acides aminés, peptides, peptones ou protéines).

5.1.2.3. Autres macronutriments

Outre le carbone et l'azote, les bactéries ont besoin d'autres macronutriments tels que le phosphore, le soufre, le potassium, le magnésium, le calcium, le sodium et le fer (Tableau 8).

Tableau 8 : Rôle des macronutriments (autres que C et N) dans le métabolisme bactérien (VanDemark et Batzing, 1987)

Elément	Rôle pour la bactérie
P (Phosphore)	Présent dans la nature sous forme de phosphate organique et inorganique. Il est requis par la cellule en particulier pour la synthèse des acides nucléiques.
S (Soufre)	Il a un rôle structural dans certains acides aminés (cystéine et méthionine). Le soufre est également présent dans plusieurs vitamines comme la thiamine, la biotine, l'acide lipoïque et dans le coenzyme A. La plupart du soufre chez les bactéries provient de soufre inorganique, sulfate (SO_4^-) ou sulfure (HS^-).
K (Potassium)	Indispensable pour plusieurs enzymes y compris certaines qui sont impliquées dans la synthèse des protéines.
Mg (Magnésium)	Stabilise les ribosomes, les membranes cellulaires et les acides nucléiques. Il est encore requis dans l'activité de plusieurs enzymes.
Ca (Calcium)	Il n'est pas essentiel pour la croissance de la plupart des bactéries mais favorise la stabilisation de la paroi.
Na (Sodium)	Requis par certaines mais pas toutes les bactéries et son besoin reflète souvent l'habitat d'origine de la bactérie (halophilie).
Fe (Fer)	Rôle majeur dans la respiration cellulaire. La plupart du fer est insoluble et plusieurs bactéries produisent des molécules telles que les sidérophores qui lient, solubilisent et transportent le fer dans les cellules.

5.1.2.4. Micronutriments (éléments traces)

Les micronutriments sont des métaux requis en quantités infimes. Néanmoins, leur disponibilité dans le milieu est essentielle pour permettre l'expression de nombreuses fonctions cellulaires. La plupart de ces métaux jouent un rôle structural dans un grand nombre d'enzymes (Tableau 9).

Tableau 9 : Micronutriments nécessaires à la structure de protéines (VanDemark et Batzing, 1987)

Eléments	Présent dans :
Co (Cobalt)	Vitamine B12 ; transcarboxylase (bactéries propioniques)
Cu (Cuivre)	Certaines protéines impliquées dans la respiration (cytochrome C oxydase) ou dans la photosynthèse (plastocyanines) ; certaines superoxide dismutases
Mn (Manganèse)	Activateur de plusieurs enzymes ; présent dans certains superoxide dismutases et dans des enzymes de la décomposition de l'eau du photosystème II
Mo (Molybdène)	Présent dans des enzymes contenant des flavines ; nitrogénase, nitrate réductase, certaines formate-déshydrogénases, oxo-transférases
Ni (Nickel)	La plupart des hydrogénases ; coenzyme F430 des bactéries méthanogènes; monoxyde de carbone déshydrogénase ; uréase
Se (Sélénium)	Formate déshydrogénase ; certaines hydrogénases ; sélénocystéine
Zn (Zinc)	Anhydrase carbonique ; alcool déshydrogénase ; polymérases d'ARN et d'ADN ; plusieurs protéines qui lient l'ADN

5.1.2.5. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des composés organiques qui sont requis comme les micronutriments en faible quantité. Les facteurs de croissance incluent des vitamines, des acides aminés, des purines et des pyrimidines. Bien que la plupart des bactéries soient capables de synthétiser tous ces composés (prototrophes), certains microorganismes nécessitent qu'un ou plusieurs de ces composés soit(ent) ajouté(s) au milieu de culture (auxotrophes).

Les vitamines sont les facteurs de croissances le plus souvent nécessaires. La plupart des vitamines agissent comme coenzymes. Certaines bactéries, comme par exemple les bactéries lactiques (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*), sont connues pour leur besoin en vitamines (Chambra *et al.*, 1994). Les vitamines les plus souvent requises par les bactéries sont la thiamine (vitamine B1), la biotine, la pyridoxine (vitamine B6) et la cobalamine (vitamine B12) (VanDemark et Batzing, 1987).

5.1.2.6. Milieu complexe et milieu défini

Deux grandes catégories de milieu de culture sont utilisées en microbiologie : milieux chimiquement définis et milieux chimiquement peu ou pas définis (complexes). Les milieux chimiquement définis sont préparés en mélangeant des quantités précises de chaque molécule organique ou inorganique. L'intérêt d'utiliser un tel milieu peut être le fait que cela permet d'optimiser le coût du milieu en fonction des besoins de la bactérie. Un autre avantage est que pour la production de composés d'intérêt sécrétés par les bactéries dans le milieu de culture, ces composés seront plus facilement isolés et purifiés. Cependant, dans nombreux cas, la connaissance de la composition exacte d'un milieu n'est pas cruciale et l'utilisation d'un milieu de culture complexe peut même être avantageuse.

5.2. Optimisation de la production d'EPS

L'optimisation de la production d'un EPS doit se faire de façon spécifique pour chaque souche productrice en tenant compte à la fois de ses besoins pour la production de biomasse et de la nature de l'EPS à synthétiser. Les conditions de culture peuvent avoir un impact important sur la production d'EPS non seulement au niveau de son rendement mais aussi de sa masse moléculaire et de sa composition biochimique (Kaci *et al.*, 2005 ; Morin, 1998).

5.2.1. Température

Le rôle de la température sur la production d'EPS est variable. La production d'EPS est souvent favorisée par des températures inférieures à la température optimale de croissance (Farrés *et al.*, 1997 ; Gorret *et al.*, 2001; Kojic *et al.*, 1992 ; Sutherland, 2001b ; Van den Berg *et al.*, 1995). Sutherland (2001b) suggère que quand la croissance cellulaire est ralentie par une température inférieure à l'optimale, la synthèse de la paroi cellulaire est également ralentie, rendant plus disponibles les isoprénoïdes phosphates nécessaires à la synthèse de l'EPS. Il est proposé que la disponibilité de ces lipides isoprénoïdes contrôle le niveau de synthèse d'EPS. Cependant d'autres travaux montrent que la production maximale de l'EPS s'effectue à la température optimale de croissance (De Vuyst *et al.*, 1998; Vermani *et al.*, 1997) ou à une température légèrement supérieure (Garcia-Garibay et Marshall, 1990; Macedo *et al.*, 2002). Macedo *et al.* (2002) ont mis en évidence une relation entre la croissance et la production d'EPS en fonction de la température : aux températures inférieures à l'optimale, la production d'EPS est

associée à la croissance, alors qu'aux températures supérieures à l'optimale, le rendement en EPS n'est plus couplé avec la croissance cellulaire se prolongeant pendant la phase stationnaire.

5.2.2. pH

La croissance bactérienne et la production d'EPS sont dépendantes du pH de milieu de culture (Petry *et al.*, 2000; Van den Berg *et al.*, 1995). Souvent le pH optimal pour la production d'EPS est proche de celui pour la croissance bactérienne (Gamar-Nourani *et al.*, 1998). Néanmoins, il existe des exceptions (Gorret *et al.*, 2001). Une étude de Küçük et Kivanç (2009) indique que les valeurs extrêmes du pH amènent à une forte diminution du rendement en EPS, en particulier à pH acide. Des résultats similaires ont été observés par Vermani *et al.* (1997). Enfin même si le pH optimal pour la production d'EPS dépend de l'espèce bactérienne, selon plusieurs auteurs, pour la plupart des espèces ce pH optimal est la neutralité (Vermani *et al.*, 1997 ; Williams et Wimpenny, 1977 ; Wilkinson, 1958). Dans tous les cas, l'optimisation du rendement de production de l'EPS passe par la régulation du pH tout au long du processus.

5.2.3. Disponibilité en l'oxygène

L'oxygène est essentiel pendant la phase de croissance des bactéries aérobies productrices d'EPS et pendant la phase de production de l'EPS (De Vuyst *et al.*, 1998). La disponibilité en oxygène est limitée par son taux de diffusion dans le milieu de culture. Dans les bioréacteurs, l'agitation mécanique permet d'améliorer la disponibilité de l'O₂ pour la croissance des bactéries qui va dépendre de la vitesse d'agitation. Cependant l'influence de l'agitation sur la production d'EPS n'est pas claire. Certaines études mettent en évidence une production optimale d'EPS en conditions de faible agitation (Dudman, 1964 ; Küçük et Kivanç, 2009), alors que d'autres démontrent que la production d'EPS est à son maximum dans des conditions de forte aération (Duta *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2001). D'où la nécessité d'adapter les conditions d'aération (agitation et/ou bullage d'air stérile) à la bactérie productrice d'EPS.

5.2.4. Source de carbone

Les bactéries ont une capacité à utiliser différents substrats carbonés pour leur croissance et la production d'EPS (Stülke et Hillen, 1999), mais le rendement de production d'EPS peut varier en fonction du substrat carboné utilisé (Cerning *et al.*, 1994 ; Datta et Basu, 1999 ; Degeest et De Vuyst, 2000 ; Grobбен *et al.* 1996). L'influence de la nature de substrat carboné sur la composition biochimique de l'EPS doit être vérifiée pour chaque souche dont on cherche à optimiser la production d'EPS. La plupart des études concluent que la composition chimique reste constante en présence de différentes sources de carbone (Breedveld *et al.*, 1994 ; Degeest et De Vuyst, 2000 ; Manca de Nadra *et al.*, 1985 ; Van den Berg *et al.*, 1995 ; Wilkinson *et al.*, 1955 ; Williams et Wimpenny, 1977), tandis que d'autres indiquent que la composition chimique de l'EPS est variable selon la nature du substrat carboné utilisé (Cerning *et al.*, 1994 ; Grobбен *et al.*, 1996 ; Kojic *et al.*, 1992 ; Petit *et al.*, 1991 ; Petry *et al.*, 2000).

5.2.5. Source d'azote

Les bactéries productrices d'EPS peuvent utiliser plusieurs sources d'azote incluant généralement l'ammonium, le nitrate et les acides aminées (Amarger, 2001; Sutherland, 1990). Selon Sutherland (1990) les sels d'ammonium et les acides aminés sont les plus

fréquemment utilisés. L'importance du choix de la source d'azote est liée au fait que les rendements de production d'EPS peuvent varier selon la nature de la source d'azote utilisée (Datta et Basu, 1999 ; De et Basu, 1996 ; Degeest et de Vuyst, 1999). Degeest et de Vuyst (1999) ont également montré que la masse moléculaire de l'EPS formé est influencée par la nature de la source d'azote (Degeest et de Vuyst, 1999).

En fait un facteur très important dans l'induction de la production d'EPS et sur lequel il y a un bon accord entre plusieurs différentes études est le ratio C/N plus élevé par rapport à celui nécessaire pour la croissance bactérienne (Corpe, 1964 ; D'Haese et al., 2004 ; Duguid et Wilkinson, 1953 ; Farrés et al., 1997 ; Quelas et al., 2006 ; Williams et Wimpenny, 1977). Ce phénomène est dû au fait que dans ces conditions, tout le surplus de carbone restant peut être utilisé spécifiquement pour la synthèse d'EPS.

5.2.6. Autres nutriments

Outre le rôle important de la nature et la concentration en C et en N, d'autres éléments tels que le potassium, le calcium, le magnésium, le manganèse et le phosphate doivent être également pris en compte pour la production d'EPS (Bergersen, 1960 ; De Souza et Sutherland, 1994 ; Vanhooren et Vandamme, 1998). Par exemple l'apport de calcium dans le milieu augmente la production d'EPS chez *Myxococcus xanthus* (Kim et al., 1999). L'addition de manganèse dans un milieu de *Lactobacillus casei* CRL 7 double la production d'EPS (Kim et al., 1999 ; Mozzi et al., 1995a ; Mozzi et al., 1995b). Certaines études ont montré que la limitation en différents nutriments, comme par exemple le phosphate et le soufre, peuvent améliorer la production d'EPS (Doherty et al., 1988 ; Leigh et Walker, 1994). L'ajout de vitamines dans le milieu de culture de *Rhizobium sp.* stimule la croissance bactérienne et la production d'EPS (Bergersen, 1960 ; De et Basu, 1996).

5.2.7. Phase de croissance bactérienne

La croissance bactérienne s'effectuant dans un système de culture en batch et la production d'EPS liée varient en fonction du temps. Par exemple certains EPS sont produits pendant la phase exponentielle de croissance, tandis que d'autres ne sont produits que vers la fin de la phase exponentielle ou pendant la phase stationnaire (Sutherland, 2001b). Deux exemples de synthèse d'EPS, s'effectuant pendant la phase exponentielle de croissance, sont la production de gellane et celle de cellulose bactérienne (Chawla et al., 2009 ; Fialho et al., 2008). Chez *Xanthomonas sp.*, l'initiation de la production de xanthane s'effectue pendant la phase exponentielle de croissance, mais le taux de production d'EPS se poursuit alors que la croissance bactérienne est ralentie voire arrêtée. (Yang et al., 2007). Certains EPS sont produits seulement vers la fin de la phase stationnaire comme le curdlan (McIntosh et al., 2005). Plusieurs études ont montré que si le rendement en EPS varie avec la phase de croissance bactérienne, sa composition reste constante pendant le cycle de croissance en batch (Breedveld et al., 1993 ; De Vuyst et al., 1998).

6. Méthodes d'extraction/purification des EPS

Les objectifs principaux de l'extraction d'un EPS sont d'obtenir un rendement optimal en EPS sans modifier sa composition et sans lyser les cellules bactériennes (risque de libération de toxines et autres composés indésirables). La nature des EPS récoltés dépend fortement de la méthode d'extraction utilisée. En général ces méthodes reposent

sur des principes physiques et/ou chimiques. L'extraction physique des EPS consiste à utiliser des techniques de centrifugation, d'homogénéisation, de mélange, de sonication ou de traitement par la chaleur. Les méthodes chimiques impliquent l'utilisation de diverses substances chimiques pour rompre les liaisons au sein de la matrice exopolymérique afin de faciliter la mise en solution de l'EPS. En général, le rendement d'extraction par simples méthodes physiques est plus faible que celui obtenu en combinant les méthodes physiques et chimiques.

Comme mentionné dans le paragraphe 1.1. de la synthèse bibliographique, les EPS bactériens peuvent se détacher facilement de la surface bactérienne et être libérés dans le milieu de culture ou rester fermement liés à la surface cellulaire. Les protocoles d'extraction doivent être adaptés à cette caractéristique de liaison des EPS à la surface bactérienne. Parmi les différents protocoles pouvant être mis en œuvre, il faut également prendre en compte les propriétés physico-chimiques des EPS, en particulier la nature et la quantité de charges exposées (neutre vs polyanionique), afin d'optimiser le protocole d'extraction.

6.1. Extraction d'EPS

Le protocole standard pour extraire un EPS facilement détachable de la surface cellulaire est simple à mettre en œuvre. Dans la plupart des cas, il comprend trois étapes principales : les cellules bactériennes sont tout d'abord éliminées, l'EPS est ensuite précipité dans l'alcool, le plus souvent l'éthanol, et enfin le polymère est récupéré (Matsuyama *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2013).

L'élimination de la biomasse cellulaire s'effectue le plus souvent par une centrifugation, séparant les bactéries, qui restent dans le culot, de l'EPS, qui reste en suspension dans le surnageant. Quand la viscosité du milieu est trop importante, celui-ci peut être soit dilué avec de l'eau distillée, soit chauffé pour inactiver les bactéries et les enzymes dégradant le polymère et, en même temps, diminuer la viscosité (Capron *et al.*, 1998 ; Kanmani *et al.*, 2011 ; Torres *et al.*, 2011). Un traitement enzymatique peut également faciliter l'élimination des cellules (Patton, 1962). Par exemple, Murofushi *et al.* (1997) ont développé un procédé utilisant des protéases alcalines et le lysozyme. Il est également possible d'utiliser des traitements chimiques qui conduisent à la lyse cellulaire, mais dans ce cas l'agent chimique risque d'être responsable de l'hydrolyse de l'EPS (Smith et Pace, 1982). De façon générale, l'élimination chimique ou enzymatique des cellules est à éviter à cause du relargage de produits intracellulaires pouvant contaminer le produit final.

L'étape suivante consiste à précipiter les EPS dans l'alcool.

6.2. Extraction d'EPS fermement attaché à la surface cellulaire

Le détachement des EPS fortement liées aux bactéries nécessite des méthodes spécifiques d'extraction (Flemming et Wingender, 2010). Ceci ne facilite pas l'extraction, d'autant plus que le protocole utilisé doit rester suffisamment doux pour ne pas endommager les cellules et ainsi contaminer les EPS avec des polymères intracellulaires. L'extraction commence par la dispersion des constituants de la membrane externe en rompant les interactions physico-chimiques impliquées dans la fixation de l'EPS (Flemming, 2011). Ainsi, les liaisons ioniques peuvent être rompues avec un agent complexant (EDTA ou EGTA) ou une résine échangeuse de cations (Dowex®). Les méthodes d'extraction utilisant ces agents chimiques permettent d'éliminer les cations

bivalents (essentiellement Ca^{2+} et Mg^{2+}) impliqués dans les interactions ioniques des EPS chargés (polysaccharides polyanioniques). Par ailleurs, des méthodes d'échanges de cations basées essentiellement sur l'utilisation de NaCl ont été employées pour l'extraction des EPS de *Pseudomonas putida* et de *Pseudomonas fluorescens* (Read et Costerton, 1987). D'autres méthodes d'extraction utilisent le traitement alcalin par l'addition de soude qui induit la formation de groupes chargés tels que des groupes carboxyles dans les protéines et les polysaccharides. Il en résulte une forte répulsion entre les EPS et permet alors leur solubilisation. Une hydrolyse alcaline de certains polymères peut être réalisée pour rompre les liaisons covalentes (disulfures des glycoprotéines) (Zayas, 1997). De tels traitements sont réalisés dans des conditions de pH variant entre 9 et 13, grâce à l'addition de NaOH (Myszka et Czaczyk, 2009). Un traitement alcalin peut être couplé à d'autres techniques d'extraction. Par exemple Tago et Aida (1977) utilisent des techniques basées sur l'élévation du pH (avec NH_4OH) couplée à une digestion enzymatique pour l'extraction des EPS. D'autres protocoles reposent, à l'inverse, sur une baisse du pH. L'acide trichloracétique (TCA) est souvent utilisé en raison de sa capacité à précipiter les protéines, facilitant non seulement l'extraction des EPS mais également leur purification partielle (Ozturk et Aslim, 2010 ; Górska-Frączek *et al.*, 2011 ; Säwén *et al.*, 2010). D'autres traitements acides sont également possibles, comme par exemple l'extraction au Tris-acétate (Starr *et al.*, 2013) ou à l'acide sulfurique (Sun *et al.*, 2012).

Cependant, l'utilisation de ces traitements chimiques pour séparer les EPS des cellules bactériennes peut conduire à la déstructuration des parois cellulaires et donc à la libération de constituants cellulaires dans le milieu, notamment des lipopolysaccharides. Ils contaminent les échantillons et/ou modifient les propriétés biochimiques des EPS (Comte *et al.*, 2006). Il existe plusieurs tests permettant de déterminer la présence de contaminants pouvant provenir d'une lyse cellulaire : dosage de l'enzyme intracellulaire glucose-6-phosphate déshydrogénase ou dosage de l'ATP. Une présence significative de ces deux molécules intracellulaires dans les échantillons d'EPS révèle une contamination par des polymères intracellulaires. L'ADN, quant à lui, ne peut pas être un bon témoin de lyse puisqu'il peut être présent naturellement dans la matrice extracellulaire, mais une concentration trop élevée dans l'échantillon extrait peut être un bon indice. Des méthodes plus directes, comme l'observation au microscope ou l'utilisation du kit *Live/Dead*, sont aussi des moyens efficaces de contrôle. Une protection des cellules contre la lyse est parfois recherchée par l'utilisation de formaldéhyde ou de glutaraldéhyde (Azeredo *et al.*, 2003).

6.3. Purification des EPS extraits

La purification représente la séparation physique d'une substance chimique d'intérêt de substances contaminants ou plus largement de molécules non-cibles. Dans ce contexte la purification des EPS à partir de la culture bactérienne signifie l'élimination à la fois des microorganismes producteurs et leurs métabolites sécrétés, des composants du milieu de culture et des composés chimiques utilisés pendant l'extraction. Les composés non désirés incluent les protéines, les acides nucléiques, les lipides, les différents sels provenant du milieu, les solvants et les agents chimiques. L'utilisation de milieux complexes, contenant une large gamme de molécules pour la culture bactérienne augmente la difficulté de la purification des EPS détachés. Dans certains cas particuliers, des étapes supplémentaires de purification sont nécessaires pour éliminer les protéines et autres composés. Par exemple pour les EPS obtenus à partir de milieux de culture très riches en protéines (comme le lait écrémé pour les bactéries lactiques)

trois approches sont souvent utilisées : la précipitation avec des quantités variables de TCA (concentration finale de 4 à 14 %), la digestion avec des protéinases ou la combinaison des deux (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005 ; Säwén *et al.*, 2010 ; Górska-Frączek *et al.*, 2011). Plusieurs protéinases peuvent être utilisées pour la purification, mais le plus souvent dans la littérature sont citées la protéinase K (Starr *et al.*, 2013) et la pepsine (Liu *et al.*, 2010). Il existe également des traitements, comme la méthode Sevag, qui permettent d'éliminer les protéines et les lipides simultanément (Su *et al.*, 2013). L'élimination des acides nucléiques se fait le plus souvent enzymatiquement par digestions avec une RNase et une DNase (Górska-Frączek *et al.*, 2011 ; Starr *et al.*, 2013).

D'autres procédures relativement simples à mettre en œuvre comme la filtration, la dialyse et la lyophilisation sont également appliquées pour la purification des EPS. Les techniques de filtration membranaires incluent la microfiltration, l'ultrafiltration, la diafiltration et la filtration tangentielle. La filtration par les membranes synthétiques permet la séparation des molécules d'EPS de composés ayant une faible masse moléculaire. Les différences entre les procédures de filtration sont généralement basées sur la différence de la taille des pores des membranes. La dialyse a, elle aussi, toute son importance car elle permet d'éliminer les molécules de faible masse moléculaire, ce qui est primordial lors de la purification de l'EPS à partir de milieux de culture très riches en sels. Ces derniers peuvent en effet perturber les étapes ultérieures de caractérisation des EPS, comme les dosages colorimétriques ou les analyses par chromatographie. Enfin la lyophilisation permet de se débarrasser des composés volatiles comme l'éthanol.

Après lyophilisation les EPS peuvent être purifiés par des techniques de chromatographie. Cette purification supplémentaire est surtout nécessaire pour des échantillons utilisés pour des analyses structurales. Les paramètres impliqués dans le choix des techniques chromatographiques adaptées à la nature de l'EPS sont la charge, la solubilité et la masse moléculaire. La séparation par taille se fait par chromatographie d'exclusion stérique. Elle est souvent appliquée dans les cas de complexes macromoléculaires ou de molécules de haute masse moléculaire non chargées. La chromatographie ionique est applicable pour des EPS chargés ou neutres. Enfin les fractions de la chromatographie sont récupérées et analysées.

Chapitre 1 :

Optimisation des conditions
de culture pour la production
d'EPS par *R. tataouinensis*
TTB310

Dans ce chapitre nous présentons les résultats des travaux visant à optimiser la croissance bactérienne de *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (Rta) sous forme de kystes, afin de maximiser la production d'EPS par cette souche. L'hypothèse sous-jacente à ce travail de thèse est que l'EPS de Rta pourrait avoir une composition et une structure originale et donc des propriétés particulièrement intéressantes, permettant par exemple d'expliquer la tolérance de cette bactérie à la dessiccation. Comme nous allons le voir dans ce chapitre, l'optimisation du milieu de culture est originale par rapport à celle qui a été mise en œuvre pour d'autres bactéries utilisées pour des applications biotechnologiques. Pour mieux comprendre les différences, nous avons défini trois objectifs à atteindre : i/l'optimisation de la production de biomasse, ii/l'enrichissement de la biomasse en kystes et iii/l'optimisation de la production d'EPS par les kystes. Si nous comparons cette optimisation avec celle des souches productrices d'EPS utilisées industriellement (e.g. *Xanthomonas*, *Rhizobium*), la principale différence réside dans le fait que nous devons optimiser la croissance de kystes pour optimiser la production d'EPS. Ce point est particulièrement original, car cette bactérie est capable de se diviser sous forme de bâtonnets mais aussi de kystes, contrairement aux autres bactéries produisant des kystes et pour lesquelles seule la division des bâtonnets n'est possible (e.g. *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhodospirillum*).

J'ai réalisé et interprété la totalité des expériences présentées dans ce Chapitre 1, qui ont été effectuées au LEMiRE pour les cultures en batch et dans les locaux de la société ARD (Pomacle, Reims) pour les cultures en fed-batch, grâce aux conseils de Ghislain SANHAJI.

1. Introduction

En guise d'introduction, nous allons présenter dans un premier temps les connaissances acquises sur cette bactérie, en particulier en relation avec son cycle cellulaire et sa capacité à produire un EPS.

1.1. Le cycle cellulaire de *R. tataouinensis* TTB310

La bactérie utilisée dans le cadre de cette étude est *Ramlibacter tataouinensis* TTB310. À la suite de l'isolement de *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (Rta) (Heulin *et al.*, 2013), la première caractéristique très intéressante observée a été son cycle cellulaire. En effet, le cycle cellulaire de Rta comporte une phase de différenciation (de kystes en bâtonnets) et une phase de dé-différenciation (de bâtonnets en kystes) (Fig. 9).

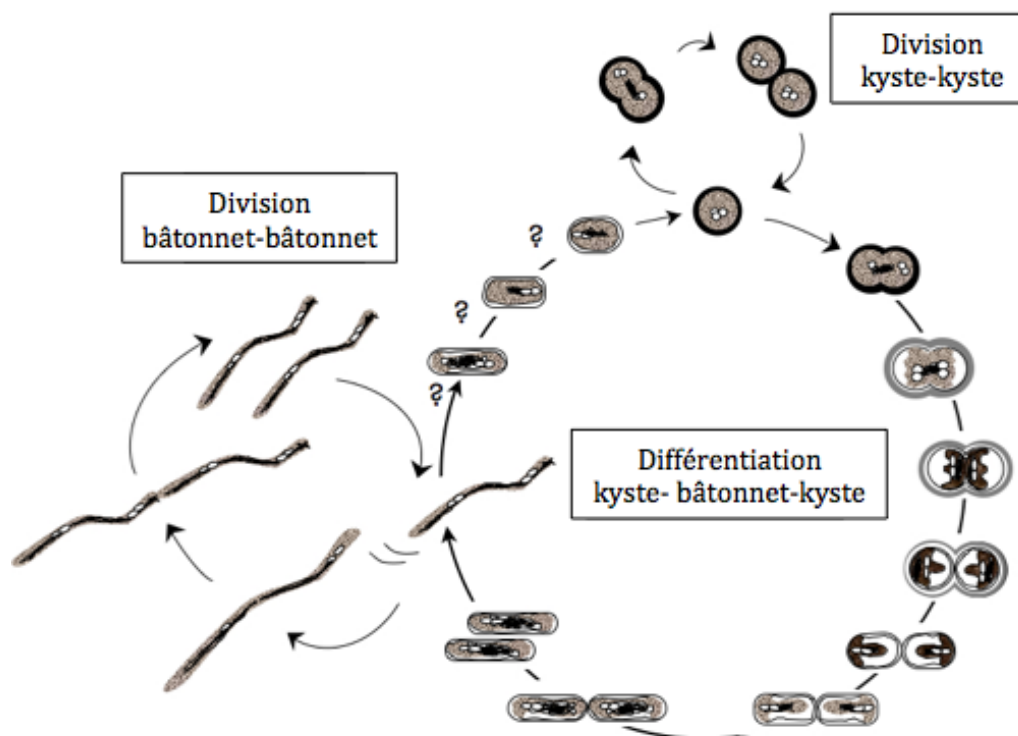


Figure 9 : Schéma du cycle cellulaire de *Ramlibacter tataouinensis* sur milieu TSA/10
 (De Luca *et al.*, 2011)

Le fait que les deux formes soient capables de se diviser, et plus particulièrement la division des kystes, est une propriété originale de cette bactérie. Par définition, chez les autres espèces bactériennes connues pour s'enkyster comme par exemple *Azotobacter* et *Azospirillum* les kystes sont quiescents (*i.e.* incapables de se diviser) et sont surtout capables de tolérer la dessiccation (Socolofsky *et al.*, 1962 ; Sadasivan et Neyra, 1985). En effet les kystes de Rta, même s'ils sont capables de se diviser, ont toutes les caractéristiques d'un kyste dans le mesure où l'EPS produit par ces formes sphériques permet à la bactérie de tolérer la dessiccation, tandis que les bâtonnets sont des formes mobiles qui se déplacent par "*gliding motility*" sur un milieu gélosé, ne produisant pas d'EPS (Benzerara *et al.*, 2004 ; Gommeaux *et al.*, 2005).

Dans ce chapitre, nous présentons des résultats relatifs à la production d'EPS par les kystes de Rta, en soulignant les difficultés rencontrées dans l'optimisation de la croissance de Rta et la production d'EPS. Tout ceci en liaison avec la petite taille de la bactérie sous forme de bâtonnets, la forte adhésion de l'EPS à la paroi cellulaire et la quantification de la production d'EPS.

1.2. Production d'EPS par les kystes de *R. tataouinensis* TTB310

L'analyse du génome de Rta TTB310 (de Luca *et al.*, 2011) a permis de mettre en évidence que la majorité (28/40) des glycosyl-transférases (GTs) sont impliquées dans la formation de liaisons glycosidiques de type "équatoriales" (liaisons de type β). Il en va de même pour les glycosyl-hydrolases (GHs) qui sont quasiment toutes impliquées dans l'hydrolyse des liaisons de type β (24/25). Afin de confirmer que l'enchaînement des résidus glucosidiques de l'EPS de Rta implique des liaisons glycosidiques de type β , nous avons utilisé une méthode de révélation des EPS, impliquant des liaisons glycosidiques

de type β 1-3 ou β 1-4, qui repose sur leur coloration au Calcofluor-white, suivie d'une observation en microscopie à fluorescence.

Cette technique a été appliquée sur des colonies de Rta après 5 jours de culture. À l'échelle d'une colonie, on observe des kystes essentiellement au centre des colonies et des bâtonnets à la périphérie des colonies. Dans la zone de mélange "kystes + bâtonnets" (Fig. 10A), seules les zones contenant des kystes présentent une fluorescence (Fig. 10B). Dans la zone "frontière", entre kystes et bâtonnets (Fig. 10C), seule la partie supérieure contenant des kystes est fluorescente (Fig. 10D).

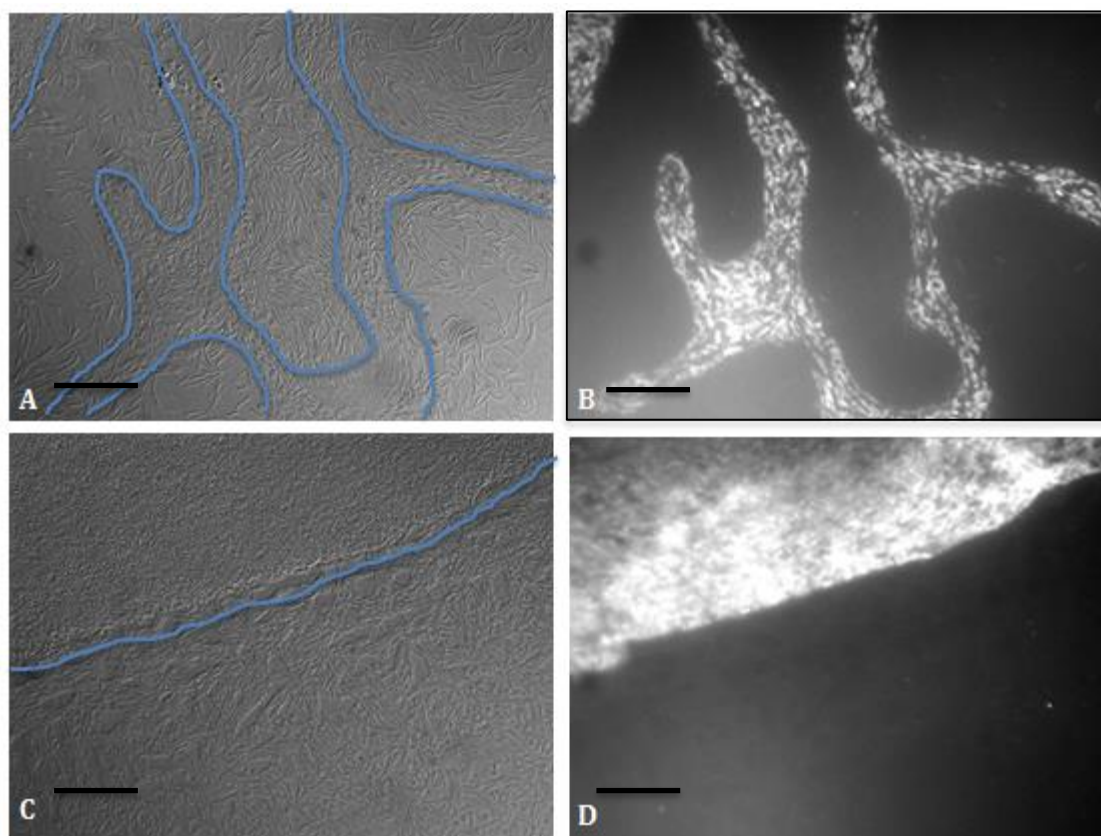


Figure 10 : Production d'EPS que par les kystes, observée par microscopie optique et microscopie en fluorescence des colonies de Rta marquées au Calcofluor-white. Les colonies ont été obtenues sur milieu TSA/10 + β -hydroxybutyrate 10 mM, incubées à 30 °C pendant 5 jours. **A)** et **C)** Images en microscopie optique du bord de deux colonies où les kystes et les bâtonnets sont bien différenciables. **B)** et **D)** Images en microscopie à fluorescence correspondant respectivement aux photos **A)** et **C)** montrant la fluorescence émise par les kystes. Barre d'échelle : 20 μ m (microscope : grossissement x1000)

L'observation d'un agrégat de kystes (Fig. 11A) met en évidence une fluorescence de l'ensemble des kystes (Fig. 11B) avec, à l'échelle d'un kyste en périphérie de l'agrégat, une fluorescence plus intense autour des kystes.

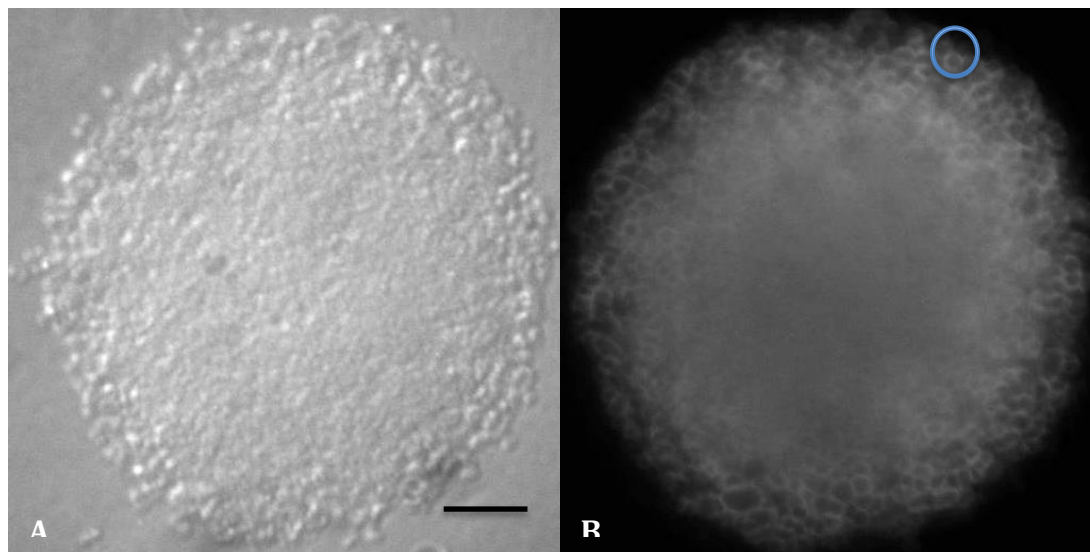


Figure 11 : Image plus détaillée de la fluorescence d'EPS réalisée par l'observation d'une colonie de Rta en microscopie optique **(A)** et microscopie en fluorescence **(B)**. La colonie a été obtenue sur un milieu TSA/10 en présence de NaCl 0,4 % à 30 °C pendant 5 jours et ensuite marquée au Calcofluor-white. Un exemple de kyste, montrant une fluorescence maximale en périphérie, est entouré par un cercle bleu. Barre d'échelle : 20 μ m (microscope : grossissement x1000)

Ces expériences de marquage des colonies de Rta au Calcofluor-white confirment que seuls les kystes synthétisent un EPS et que les liaisons glycosidiques impliquées dans cet EPS sont de type β 1-3 et/ou β 1-4.

2. Matériel et Méthodes

La bactérie utilisée dans ce travail est *R. tataouinensis* TTB310 (Rta) fournie par le laboratoire d'écologie microbienne de la rhizosphère et Environnement extrêmes (LEMIRE, CEA Cadarache). *R. tataouinensis* TTB310 est β -protéobactérie isolée au LEMIRE à partir de sable enrobant un fragment de météorite, dans la région semi-désertique de Tataouine (Tunisie) (Heulin *et al.*, 2003).

2.1. Cultures de Rta en batch (tubes, Erlenmeyers)

2.1.1. Milieux de culture

Le milieu utilisé pour la culture de Rta est le TSB dilué au dixième (TSB/10 pour Tryptic Soy Broth/10) contenant tous les cofacteurs permettant sa croissance. Le TSB/10 (Difco) est composé de :

	[g/L]
Peptone de caséine	1,7
Peptone de soja	0,3
Dextrose	0,5
NaCl	0,5
K ₂ HPO ₄	0,25
Eau ultrapure	qsp 1 L

Pour tester l'effet des sources de carbone, le milieu TSB/10 a été supplémenté par un des composés suivants : acétate de sodium, succinate de sodium, β -hydroxybutyrate de sodium, lactate de sodium, à différentes concentrations : 10 ; 20 ou 40 mM. L'effet des carbonates a été examiné en ajoutant dans le milieu TSB/10 du carbonate de calcium, du bicarbonate de sodium ou du carbonate de potassium aux concentrations finales suivantes : 5, 10 ou 15 mM.

La tolérance à la pression osmotique a été testée en présence de 2 g/L et 5 g/L de saccharose ajouté dans le milieu TSB/10. La tolérance à la force ionique en fonction de la présence de système tampon a été testée en ajoutant au TSB/10 différentes concentrations de Na_2HPO_4 et KH_2PO_4 : respectivement 6 et 3 g/L ; 3 et 1,5 g/L ; 1 et 0,5 g/L. Le pH est ajusté à 7,4 avec KOH et HCl avant la stérilisation du milieu.

Les essais de résistance à la force ionique ont été réalisés dans le milieu suivant (TSB/10 sans NaCl) :

	[g/L]
Peptone de caséine	1,7
Peptone de farine de soja	0,3
Dextrose	0,5
K_2HPO_4	0,25
Eau ultrapure	qsp 1 L

dans lequel KCl est ajouté aux concentrations finales suivantes (%) : 0,05 ; 0,3; 0,4 et 0,6, ou NaCl aux concentrations finales suivantes (%) : 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,45; 0,5; 0,6; 0,8 et 1. Des essais supplémentaires de tolérance à la pression osmotique ont été réalisés en ajoutant du saccharose (2 ou 5 g/L) au TSB/10.

L'effet du NaCl sur l'enkystement a été testé en rajoutant dans les cultures de Rta, après 3 jours de croissance TSB/10+10 mM lactate, une solution stérile de NaCl 10 % jusqu'à concentration finale de 0,4 %.

La croissance de Rta a également été testée en présence de concentrations variables en caséine, peptone et extrait de levure :

	[g/L]			
Peptone de caséine	0	0,5	1,0	1,5
Extrait de levure	0,1	0,2	0,3	0,4
NaCl	0,5			
K_2HPO_4	0,25			

L'influence des micro- et macro-éléments sur la croissance de Rta a été examinée dans un milieu composé de :

Tryptone	4,0 g/L
Extrait de levure	1,3 g/L
Lactate	Concentration finale 10 mM
Solutions minérale	50 mL
Eau ultrapure	qsp 1 L

Solution minérale

EDTA (Tritriplex II)	0,4 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 g/L

FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,44 g/L
Solution d'éléments	20 mL
Eau ultrapure	qsp 1 L

Solution d'éléments

ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,24 g/L
MnSO ₄ , H ₂ O	1,59 g/L
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,75 g/L
H ₃ BO ₃	2,8 g/L
Cu(NO ₃) ₂ , 3H ₂ O	0,01 g/L
Eau ultrapure	qsp 1 L

Le pH a été ajusté à 7,0 avec KOH et HCl. La solution minérale et la solution d'éléments ont été préparées séparément et stérilisées respectivement par autoclavage et par filtration (diamètre des pores : 0,2 µm). Ils ont été ajoutés après la stérilisation par autoclavage des autres composants en solution.

Tous ces milieux ont été stérilisés par autoclavage pendant 20 min à 121 °C.

2.1.2. Conditions de culture

Les essais de comparaison des sources de carbone, de développement en présence des carbonates, de tolérance à la pression osmotique, d'optimum de température et de concentration en tryptone et extrait de levure, pour la croissance de *Rta* ont été réalisés dans des tubes à essai de 30 mL contenant 10 mL de milieu de culture. Les essais d'influence des micro- et macro-éléments ont été réalisés dans des fioles erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu de culture. Les expériences d'estimation de poids sec ont été réalisées dans des fioles erlenmeyer de 500 mL contenant 150 mL de milieu de culture. Généralement deux à trois répétitions ont été faites pour chaque traitement. La durée de la culture a été fixée à 3 jours, l'agitation à 150 rpm. Dans les milieux où *Rta* se développait moins bien, la durée de culture a été prolongée jusqu'à une semaine. La température était de 30 °C sauf dans le cas où son effet a été testé (20, 25 et 30 °C). La recherche de l'optimum de pH a été effectuée en ajustant le pH du milieu TSB/10 à 6,5 ; 7 ; 8 ; 8,5 avec de NaOH ou HCl.

2.1.3. Dépôts de cultures liquides sur milieu solide

Pour évaluer la croissance de *Rta* et sa production d'EPS nous avons déposé une goutte de 15 µL de pré-culture de *Rta* (TSB/10) sur différents milieux gélosés (TSB/10 + 15 g/L agar) :

- TSA/10 supplémenté de différentes sources de carbone : β -hydroxybutyrate (10 ou 20 mM) ; succinate 10 mM ; acétate 10 mM ; lactate 10 mM ;
- TSA/10 avec une concentration finale en NaCl de 0,3 % ou 0,4 % ;
- TSA/10 supplémenté de saccharose 2 ou 5 g/L
- Contrôle TSA/10.

Dans certains cas, une goutte de 15 µL de pré-culture dans TSB/10 + 20 mM β -hydroxybutyrate a été déposée sur un milieu TSA/10 + 0,4 % NaCl.

Les cultures ont été incubées sous agitation (150 rpm), pendant 3 jours, à 30 °C. Deux répétitions ont été faites pour chaque traitement et le dépôt effectué après 3 jours de pré-culture. La croissance sur milieu gélosé a été réalisée à l'obscurité, à 30 °C pendant 4 jours.

2.1.4. Estimation de la masse de matière sèche

Des filtres au seuil de coupure 0,2 μm (Whatman) ont été séchés dans une étuve à 60 °C pendant 12 h. Par la suite leur masse a été mesurée rapidement pour obtenir les valeurs de masse de matière sèche. Ils ont été ensuite laissés pendant 10 min à température ambiante pour aider à la réhydratation. La filtration des cultures bactériennes par la suite a été faite à l'aide d'une pompe à vide (Laboport). Les filtres contenant les cellules bactériennes des cultures ont été laissés à sécher à 60 °C pendant 12 h. Les filtres sont pesés et la masse de matière sèche des bactéries est obtenue par la soustraction de la masse de matière sèche des filtres.

2.1.5. Dénombrements bactériens et observations en microscopie

La pureté de toutes les cultures de *Rta* a été vérifiée en microscopie en contraste de phase avec un microscope à contraste interférentiel (BX50, Olympus), équipé d'un objectif x100 (UPlanApo, ouverture numérique = 1,35, immersion d'huile). Les images obtenues avec le microscope ont été prises avec une caméra CCD (F-View, Olympus). Les cultures de *Rta*, contenant des kystes et des bâtonnets ayant une taille et une forme particulières, sont facilement différenciables d'éventuelles bactéries contaminantes.

La croissance de *Rta*, dans les différentes conditions de culture, a été suivie par comptage des colonies sur milieu gélosé (cfu/mL). Pour ce faire trois gouttes de 5 μL des suspensions diluées de la culture ont été déposées sur le milieu TSA/10 (TSB/10 avec 15 g/L de l'agar). Après une incubation pendant 2 jours, les colonies étaient comptées à l'aide binoculaire inversée (Wilovert Will-wetzlar GmbH) avec un grossissement x4.

Dans certains cas, la croissance bactérienne a été estimée en mesurant l'absorbance à 600 nm au moyen d'un spectrophotomètre.

Les photos de dépôts (cf. paragraphe 2.1.3., chapitre 1) sont prises à l'aide de microscope stéréoscopique (Axio Zoom.V16, Zeiss).

2.2. Coloration de l'EPS au Calcofluor-white

Une solution mère Calcofluor-white à 1% a été préparée (Sigma-Aldrich-3543). Pour une meilleure solubilisation une solution de KOH 10 % a été ajoutée en goutte à goutte jusqu'à dissolution de la poudre. Les solutions diluées (0,1 %) sont stockées à l'obscurité et à température ambiante. La coloration a été réalisée par l'ajout de 2 à 5 μL de solution diluée (0,1 %) de Calcofluor-white sur les colonies de *Rta* ou dans 10 μL d'échantillon de culture. Après une incubation de 1 min à l'obscurité et à température ambiante, les observations ont été faites en microscopie de fluorescence. Ces échantillons excités avec de la lumière ultraviolette émettent dans le bleu-blanc.

2.3. Culture de *Rta* en fed-batch (bioréacteurs)

2.3.1. Pré-culture

Le but de la pré-culture est de diminuer la phase d'adaptation de *Rta* dans le milieu, au début du fed-batch. Cette préparation a été faite en deux étapes. La première consiste en une inoculation de la souche dans 5 mL de TSB/10 pour les bioréacteurs de 2, 5 et 30 L dans un milieu constitué de :

	[g/L]
Tryptone	4,0
Extrait de levure	1,3
K ₂ HPO ₄	0,25
Eau ultrapure	qsp 1 L

Les inoculations sont faites soit à partir d'une colonie prélevée sur une boîte de Petri, soit à partir d'une culture conservée dans du glycérol à -80 °C. Cette étape permet d'acclimater la souche au milieu de culture du bioréacteur (Fig. 12). L'incubation se fait à 30 °C pendant 4 jours pour les cultures développées à partir d'une colonie et pendant 6 jours pour les cultures développées à partir des cultures conservées dans le glycérol. La deuxième étape consiste à inoculer une préculture destinée pour l'ensemencement du bioréacteur avec une première culture en tube à essai (Fig. 12). Le milieu de préculture est identique à celui de la première étape. Pour les bioréacteurs de 2 et 5 L, l'inoculum représentait 1 % du volume final du milieu dans le bioréacteur et 3 % pour le bioréacteur de 30 L.

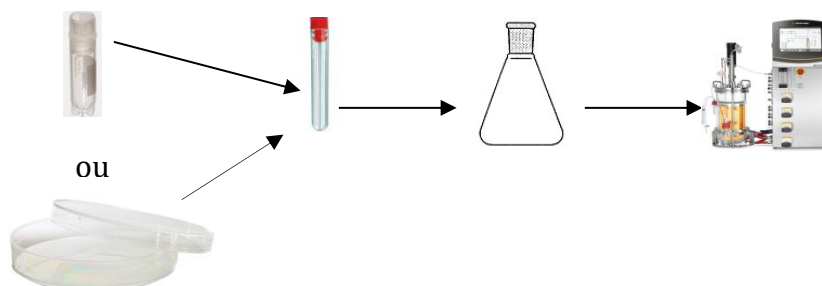


Figure 12 : Etapes de pré-cultures pour l'inoculation des bioréacteurs

2.3.2. Milieu de culture

Différents milieux ont été utilisés pour les cultures en fed-batch. Pour les essais, un volume de milieu d'1 L, de 3 L ou de 15 L a été utilisé respectivement pour les bioréacteurs de 2 L, 5 L ou 30 L.

Bioréacteur	Milieu de culture	Fed-batch
Deux de 5 L	TSB/10 supplémenté avec lactate en concentration finale 10 mM	3,0 g TSB dans 100 mL d'H ₂ O
5 L	[g/L] Tryptone 1,0 Extrait de levure 0,3 K ₂ HPO ₄ 0,25 NaCl 0,5 Lactate de sodium 10 mM	3,0 g de tryptone et 1,0 g d'extrait de levure dans 100 mL d'H ₂ O
Un de 5 L et un de 2 L	[g/L] Tryptone 4,0 Extrait de levure 1,3 K ₂ HPO ₄ 0,25 NaCl 0,5 Lactate de sodium 10 mM	1,0 g de tryptone et 0,3 g d'extrait de levure dans 30 mL d'H ₂ O

Quatre de 30 L	Solution finale		-
	Tryptone	4,0 g/L	
	Extrait de levure	1,3 g/L	
	Lactate	10 mM	
	EDTA	0,02 g/L	
	(Tritriplex II)		
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,1 g/L	
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,1 g/L	
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,022 g/L	
	Solution d'élément	1 ml	
	Solution d'éléments		
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,24 g/L	
	MnSO ₄ , H ₂ O	1,59 g/L	
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,75 g/L	
	H ₃ B ₃	2,80 g/L	
	Cu(NO ₃) ₂ , 3H ₂ O	0,01 g/L	

Le pH a été ajusté à environ 7,0 au début des fermentations, avant la stérilisation. Les bioréacteurs de 2 et 5 L sont stérilisés par l'autoclavage pendant 30 min à 121 °C. Les bioréacteurs de plus grande taille ont été stérilisés en place par injection de vapeur, selon le même barème de stérilisation. Les satellites de fed-batch et d'acide lactique 10% ont été stérilisés séparément par l'autoclavage pendant 20 min à 121 °C.

2.3.3. Conditions des cultures en fed-batch

Les bioréacteurs de 2 et 5 L sont de marque Sartorius BIOSTAT Bplus Twin 2 L/5 L (Fig. 13A). Les deux volumes différents peuvent être liés avec un système commun de contrôle digital. Les bioréacteurs sont composés d'une cuve en verre à fond rond et d'une platine en acier inoxydable. La marque des bioréacteurs 30 L est Sartorius Biostat Cplus-C20-3MO (Fig. 13B). Leur capacité de 2, 5 et 30 L correspond respectivement à un volume utile de travail minimum de 0,6 L, 0,6 L et 9 L. Ils sont munis d'une agitation mécanique et de sondes pour la détection de mousse, la détection du pH, de la température et de la concentration en oxygène dissous. La calibration des sondes pH, pO₂ et température est faite avant chaque culture en fed-batch. Ceci permet la régulation de ces paramètres. Les bioréacteurs sont également équipés avec un condenseur pour la sortie de gaz.

Le pH du milieu dans le bioréacteur est mesuré à l'aide d'une électrode stérilisable à gel sous pression (Mettler Toledo pH 405 DPAS-SC/K8S). La régulation du pH est assurée par l'unité centrale du bioréacteur *via* une pompe péristaltique qui commande l'ajout d'acide lactique (10 %). En fonction de l'écart de pH par rapport à la valeur de la consigne (7,5), des impulsions de durée plus ou moins importante sont délivrées par cette pompe. La régulation de la température est faite grâce à l'unité centrale du fermenteur, elle pilote des électrovannes qui gèrent l'arrivée d'eau froide ou de vapeur en fonction de la consigne (30 °C). Le système d'agitation utilisé dans les bioréacteurs 2 L et 5 L est constitué de deux turbines Rushton. Dans le bioréacteur de 30 L, deux hélices bipales et une turbine Rushton sont mises en œuvre. La vitesse d'agitation était fixée à 1,98 m/s. La pression en oxygène dissous est mesurée avec une sonde à oxygène (Mettler inPro6800) avec un raccord Ingold. L'aération est assurée par un *sparger* en anneau situé juste en dessous de l'extrémité de l'arbre d'agitation. La mesure du débit gazeux d'entrée est effectuée par l'intermédiaire d'un débitmètre massique. Un apport d'air stérile de 0,2 vvm (volume d'air par volume de milieu par min) est fixé. Une

régulation en cascade de la concentration d'oxygène est choisie au seuil de 20 %, en commençant par l'augmentation de la vitesse d'agitation jusqu'à une limite de 3,3 m/s. Au-delà de cette limite d'agitation, l'aération augmente progressivement jusqu'à 0,5 vvm. Une pression de 200 mbar est fixée pour les bioréacteurs de 30 L.

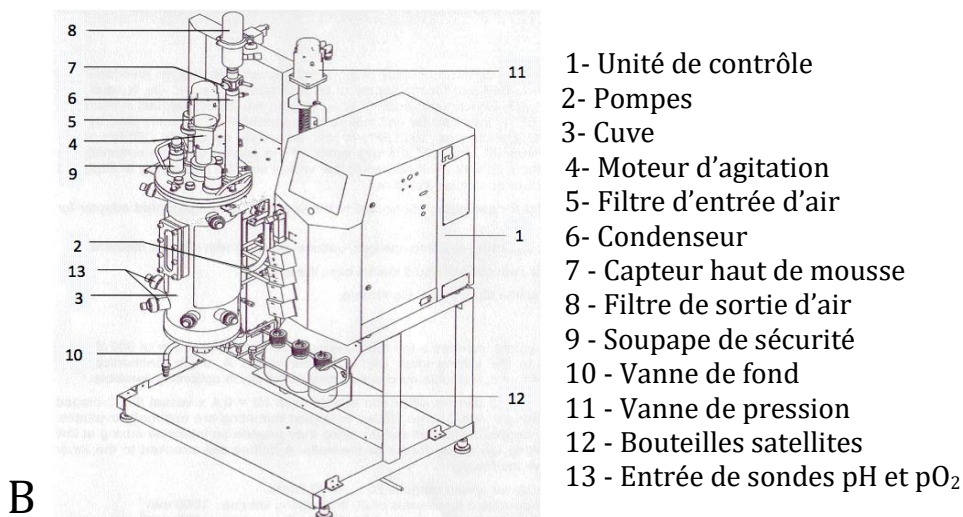
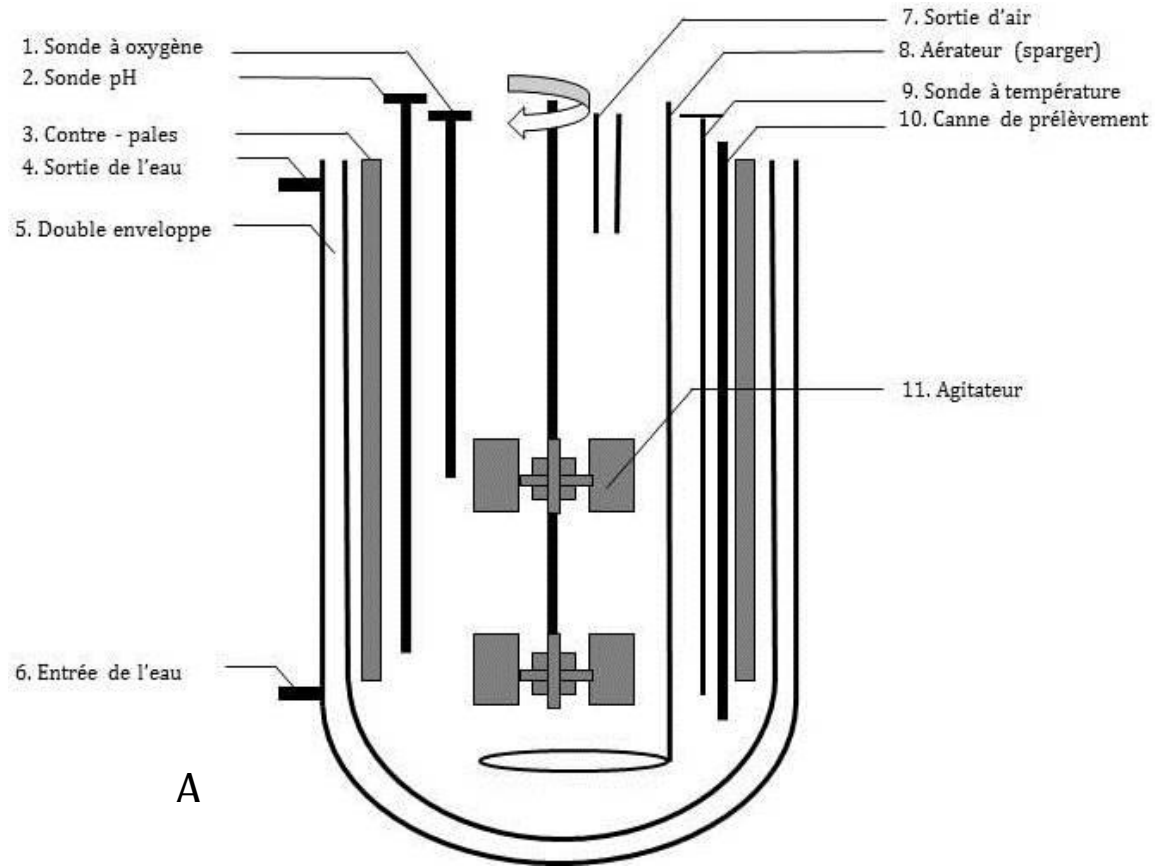


Figure 13 : Schéma des bioréacteurs utilisés. **A)** Bioréacteur de 2 et 5 L Sartorius BIostat Bplus Twin 2 L/5 L. **B)** Bioréacteur de 30 L Sartorius Biostat Cplus-C20-3MO

2.3.4. Suivi de la croissance

Avant le début de la culture en fed-batch, un prélèvement a été effectué pour vérifier le bon déroulement de la stérilisation, le changement du pH après la stérilisation et la concentration en lactate. Ensuite un prélèvement à T_0 est fait après l'inoculation. Après l'identification de la durée de la phase de latence, le prélèvement T_1 est fait au bout de 3 jours. Par la suite un prélèvement par jour a été effectué. Sur tous les prélèvements les analyses suivantes ont été réalisées :

- **Pureté de la culture**

La pureté de la culture était vérifiée en microscopie confocale et par des étalements sur milieu PCA composé de :

	[g/L]
Tryptone	5,0
Extrait de levure	2,5
Glucose	1,0
Eau ultrapure	qsp 1 L

Les observations microscopiques permettent également de connaître la proportion de kystes, d'agrégats de kystes et de bâtonnets.

- **Turbidimétrie**

La croissance bactérienne au cours de la culture a été quantifiée par la mesure de l'absorbance à 600 nm au moyen d'un spectrophotomètre. Le milieu avant inoculation ou le milieu de culture filtré à 0,2 μm sert de référence. La mesure est réalisée sur un échantillon de la culture, sans aucune dilution.

- **Dosage d'acide lactique par chromatographie liquide haute pression (HPLC)**

La consommation du lactate a été dosé par HPLC, après filtration de l'échantillon sur une membrane au seuil de coupure de 0,2 μm et une cartouche C18 activée avec 10 mL de méthanol, puis rincée avec 10 mL d'eau ultrapure. L'appareil utilisé est une HPLC U3000 (Thermo Fisher Scientific) équipée d'un réfractomètre RI101 (Shodex). La séparation a été faite par exclusion d'ions sur colonne de résine cationique Bio-Rad Aminex HPX-87H 30 x 4,6, spécifique pour la séparation des alcools, acides organiques et sucres. L'échantillon a été traité préalablement avec une pré-colonne Bio-Rad Aminex HPX-87H 300 x 7,8. La colonne est thermostatée à 45 °C, la phase mobile est une solution d'acide sulfurique 0,01 N circulant avec un débit de 0,6 mL/min. Les surfaces des pics ont été traitées par le logiciel Chroméleon 6.8. Cette surface est corrélée à une concentration par l'intermédiaire d'une courbe de calibration (3 g/L maximum).

3. Résultats

Dans ce paragraphe, nous présentons les résultats de travaux dont l'objectif était d'optimiser la croissance bactérienne de *Rta* sous forme de kystes afin de maximiser la production d'EPS par cette souche.

La plupart des bactéries productrices d'EPS utilisées industriellement comme par exemple celles appartenant aux genres *Xanthomonas* et *Rhizobium* (Yang *et al.*, 2007) forment leur EPS en phase stationnaire (Yang *et al.*, 2007; Ray *et al.*, 1998). Chez ces bactéries, la production d'EPS se fait en deux temps : une phase exponentielle visant à

obtenir une forte densité bactérienne (milieu de culture ayant un rapport C/N faible) suivie d'une phase stationnaire (rapport C/N élevé) stimulant la production d'EPS et limitant la division cellulaire. Dans le cas de la souche Rta, la situation est très différente car il faut que le milieu de culture puisse permettre la production de kystes producteurs d'EPS en majorité. L'option visant à produire, dans un premier temps des bâtonnets, en induisant ensuite la différenciation de ces bâtonnets en kystes, n'a pas été retenue car nous maîtrisons encore mal l'induction de cette différenciation. Seule l'option visant à profiter de la caractéristique unique de cette bactérie à se diviser sous forme de kystes a été retenue.

Pour mener à bien cette optimisation du milieu de culture pour la production de kystes de Rta, nous avons utilisé des données publiées sur cette souche (Heulin *et al.*, 2003). La souche Rta a été décrite comme ayant une croissance lente dans le milieu TSB/10 et ayant besoin de facteurs de croissance (pas de croissance sur milieu minimal M9). La gamme de sources de carbone assimilables avait été testée sur microplaques Biolog. La souche Rta a la capacité d'utiliser l'acétate, le pyruvate, le β -hydroxybutyrate, le γ -hydroxybutyrate, le DL-lactate et le propionate comme sources de carbone et d'énergie (Heulin *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que Rta n'utilise pas le glucose comme source de C et d'énergie et ne possède pas de transporteur de glucose (de Luca *et al.*, 2011). Concernant les conditions physiques, il a été montré que les optimums de pH et de température sont respectivement 7,5 et 30 °C (Heulin *et al.*, 2003).

L'estimation de la croissance de Rta nécessite de prendre en compte certaines particularités la différenciant des souches bactériennes ayant un cycle cellulaire "classique". La principale différence vient du fait que la division cellulaire peut provenir des kystes et/ou des bâtonnets. Le comptage des bâtonnets par le calcul du nombre de colonies formées sur milieu gélosé (cfu) ne pose pas de problème, car les bâtonnets sont rarement agrégés. Ceci permet ainsi de considérer qu'un seul bâtonnet déposé sur un milieu nutritif gélosé est à l'origine d'une colonie. Dans le cas des kystes, la situation est très différente, dans la mesure où ils se divisent généralement au sein d'agrégats cellulaires très difficiles à dissocier lors des suspensions-dilutions précédant l'étalement sur milieu gélosé. Le comptage d'une culture enrichie en kystes par la technique des cfu conduira donc à une sous-estimation du nombre réel de bactéries. Il en va de même pour une estimation de la croissance bactérienne par mesure directe de D.O. (600 nm) de la suspension bactérienne. Le problème du comptage d'une culture de Rta contenant des kystes en division est aggravé par le fait que, comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, nous avons comme objectif d'obtenir une production maximale d'EPS et donc de kystes. Afin de contrôler que la culture de Rta contient effectivement des kystes producteurs d'EPS, nous avons mesuré la D.O. et avons étalé en parallèle une suspension non-diluée sur le même milieu gélosé pour observer l'allure et l'épaisseur de ce dépôt après la croissance. Ceci permet de définir la croissance de Rta dans le milieu en question, un dépôt plus épais étant le signe d'une quantité bactérienne plus importante.

Bien que l'estimation du nombre de bactéries présentes dans une culture liquide de Rta, surtout lorsqu'elle est enrichie en kystes, par la technique des cfu, conduise à une sous-estimation de la densité bactérienne (cfu/mL), nous avons choisi de l'utiliser dans les expériences d'optimisation des conditions de culture en l'associant dans certaines cas, surtout quand les cultures étaient visiblement plus denses, à une mesure de D.O. (en prenant soin de déterminer le niveau d'enrichissement de la culture en kystes), puis de n'utiliser que la mesure de la D.O. dans les expériences en bioréacteurs et en fed-batch réalisées dans les installations du partenaire privé A.R.D. Nous avons choisi la mesure de

la D.O. pour les cultures en fed-batch car elle nous a permis de suivre les augmentations de rendement de croissance, au cours du processus d'optimisation de la production de kystes (de deux à trois fois plus important, par comparaison avec les cultures réalisées en tubes à essai ou en Erlenmeyers).

3.1. Optimisation des conditions de culture de Rta

Les paramètres d'optimisation de la culture se divisent en deux types pouvant être chimiques ou physiques. Les paramètres chimiques concernent tous les composés du milieu de culture et les paramètres physiques, le pH, l'oxygénation, la température et la pression osmotique. L'optimisation de la composition en composés chimiques et de leur concentration, ainsi que celle des paramètres physiques permettant une croissance optimale d'une souche bactérienne permet de définir les conditions optimales de sa croissance. Dans le cas de cette étude sur Rta et sa production d'EPS, les conditions optimales sont celles qui permettent à Rta de répondre à trois critères : produire le plus de biomasse, que cette biomasse soit enrichie en kystes et enfin que les kystes produisent le plus possible d'EPS. Nous allons présenter ici les données sur différentes conditions de cultures testées, permettant ainsi de définir des conditions de culture optimales.

3.1.1. Choix de la source de carbone pour la croissance de Rta

La croissance de Rta a été testée en présence de quatre sources de carbone : acétate, lactate, β -hydroxybutyrate et succinate. Le choix de ces sources de C a été dicté tout d'abord par le fait que l'acétate, le lactate et le β -hydroxybutyrate avaient été décrits comme sources de carbone permettant la croissance de la bactérie (Heulin *et al.*, 2003). Le choix du succinate est basé sur une proposition de l'industriel partenaire (A.R.D) qui dispose d'effluents de fermentation riches en acide succinique. Chacune de ces sources de carbone a été ajoutée dans le milieu TSB/10 contenant tous les cofacteurs permettant une croissance de référence.

3.1.1.1. Croissance de Rta dans le milieu TSB/10 (tubes à essai)

Nous avons effectué une dizaine d'expériences indépendantes en essayant de maintenir les mêmes conditions expérimentales. Les résultats montrent que la croissance de Rta en milieu nutritif liquide (TSB/10) varie de 10^7 à 10^8 cfu/mL (Fig. 14A) et que les D.O. associées varient de 0,06 à 0,10. Les allures de dépôts de cultures TSB/10 non dilué sur le même milieu de culture gélosé (TSA/10) (Fig. 14B et C) valident la présence des kystes qui se déposent en périphérie du dépôt, formant une périphérie plus muqueuse. Les deux dépôts (Fig. 14B et C) sont des dépôts de deux cultures issues de répétitions avec une D.O. en moyenne de 0,1. Ces allures de dépôts sont les références avec lesquelles nous comparons la croissance et la quantité en kystes dans les autres expériences visant à évaluer l'effet des différentes sources de carbone.

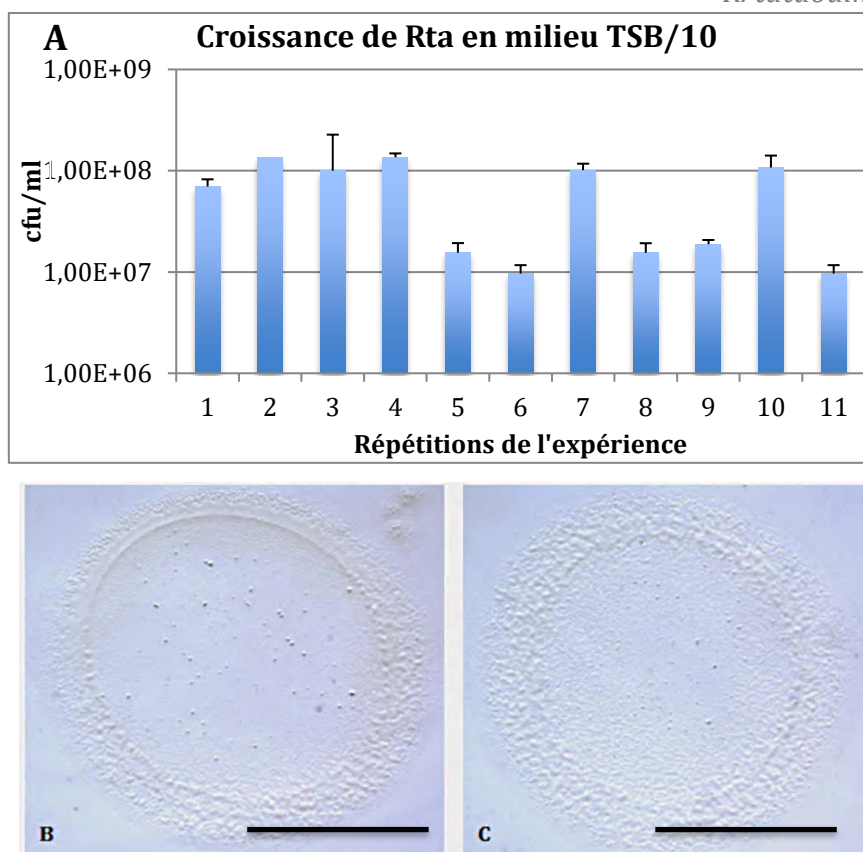


Figure 14 : Estimation de la croissance de Rta dans le milieu TSB/10 (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) **A)** par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. **B)** et **C)** dépôts de culture bactérienne en milieu liquide sur le même milieu gélosé, provenant de deux cultures issues des répétitions incubées dans les mêmes conditions pendant 4 j. La croissance sur boîte de Petri est réalisée à l'obscurité à 30 °C pendant 4 j. Barre d'échelle : 4 mm

3.1.1.2. Croissance de Rta dans le milieu TSB/10 + acétate

Même si l'acétate avait été identifié comme une source de carbone pour Rta (Heulin *et al.*, 2003), il ne permet pas d'augmenter de façon significative à 10 mM sa croissance dans nos conditions expérimentales en présence de TSB/10. Lorsque l'acétate est ajouté, à des concentrations supérieures (20 et 40 mM), il inhibe fortement sa croissance (Fig. 15A). Cette absence de réponse à 10 mM est confirmée par une D.O. moyenne de 0,06 de cultures de Rta issues des deux répétitions. Les allures de dépôts de ces deux cultures sur le même milieu gélosé TSA/10 supplémenté avec de l'acétate 10 mM sont également moins denses (Fig. 15B, C) par rapport au témoin (Fig. 14B et C). De plus, la périphérie des dépôts sur TSA/10 supplémenté avec de l'acétate 10 mM n'est pas muqueuse. Il y a donc significativement moins de kystes. Cette bordure est remplacée par un halo en forme de "soleil" qui correspond à un amas de bâtonnets mobiles (Fig. 15B, C).

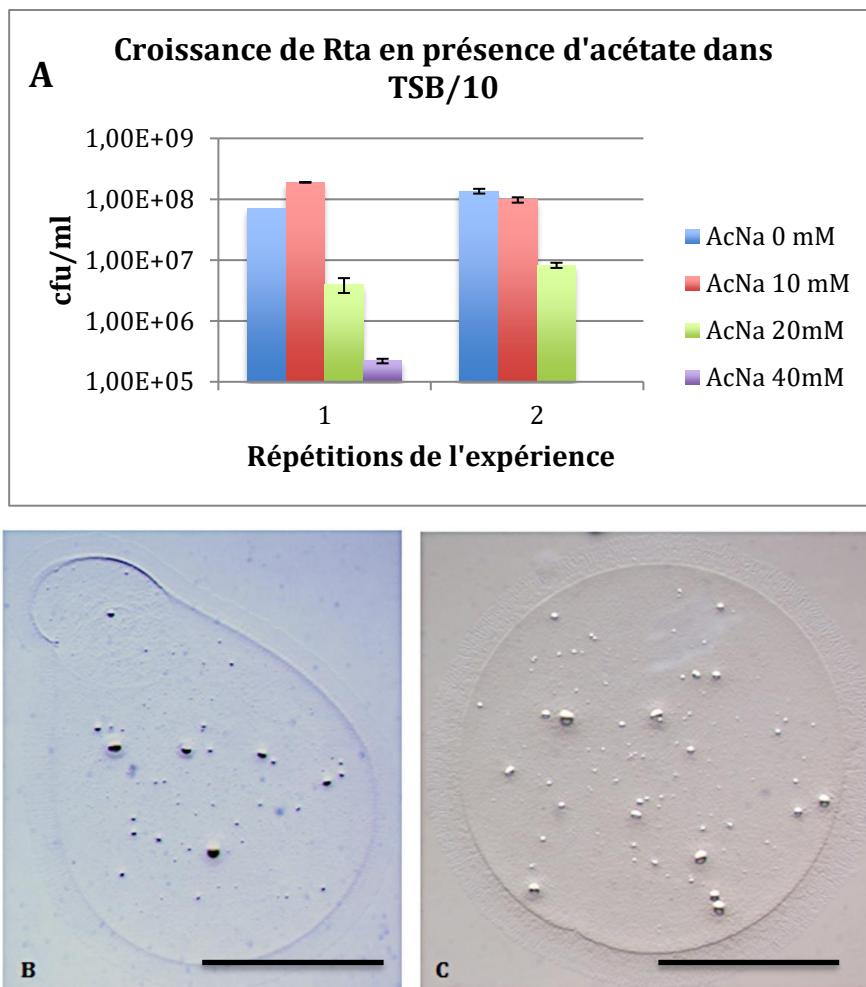


Figure 15 : Estimation de la croissance de Rta en présence de l'acétate : **A)** dans le milieu TSB/10 supplémenté avec 10, 20 et 40 mM d'acétate (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

B) et **C)** dépôts de culture bactérienne en TSB/10 + 10 mM d'acétate sur le même milieu gélosé (TSA/10 + acétate 10 mM), provenant de deux cultures issues des répétitions incubées dans les mêmes conditions que les autres cultures dans TSB/10 + d'acétate 10 mM pendant 4 jours. La croissance sur boîte de Petri est réalisée à l'obscurité à 30 °C pendant 4 j. Barre d'échelle : 4 mm

En conclusion, l'acétate est une source de C et d'énergie ne permettant pas l'optimisation de la production d'EPS par Rta.

3.1.1.3. Croissance de Rta dans le milieu TSB/10 + succinate

Une faible augmentation de la croissance de Rta, significative dans l'expérience 2, est observée en présence de succinate (10 mM), alors qu'à plus forte concentration (20 mM) l'effet du succinate est plutôt négatif sur la croissance (Fig. 16A). Le développement des dépôts bactériens non-dilués sur le même milieu gélosé n'est pas influencé par l'addition de succinate (Fig. 16B, C) car ils sont similaires aux dépôts témoins (Fig. 14B, C). Les D.O. moyennes montrent également des valeurs de 0,1, donc identiques à celles obtenues en présence de TSB/10 sans succinate. La présence des kystes est similaire à celle des témoins : un bord muqueux autour des dépôts, correspondant à la présence des kystes.

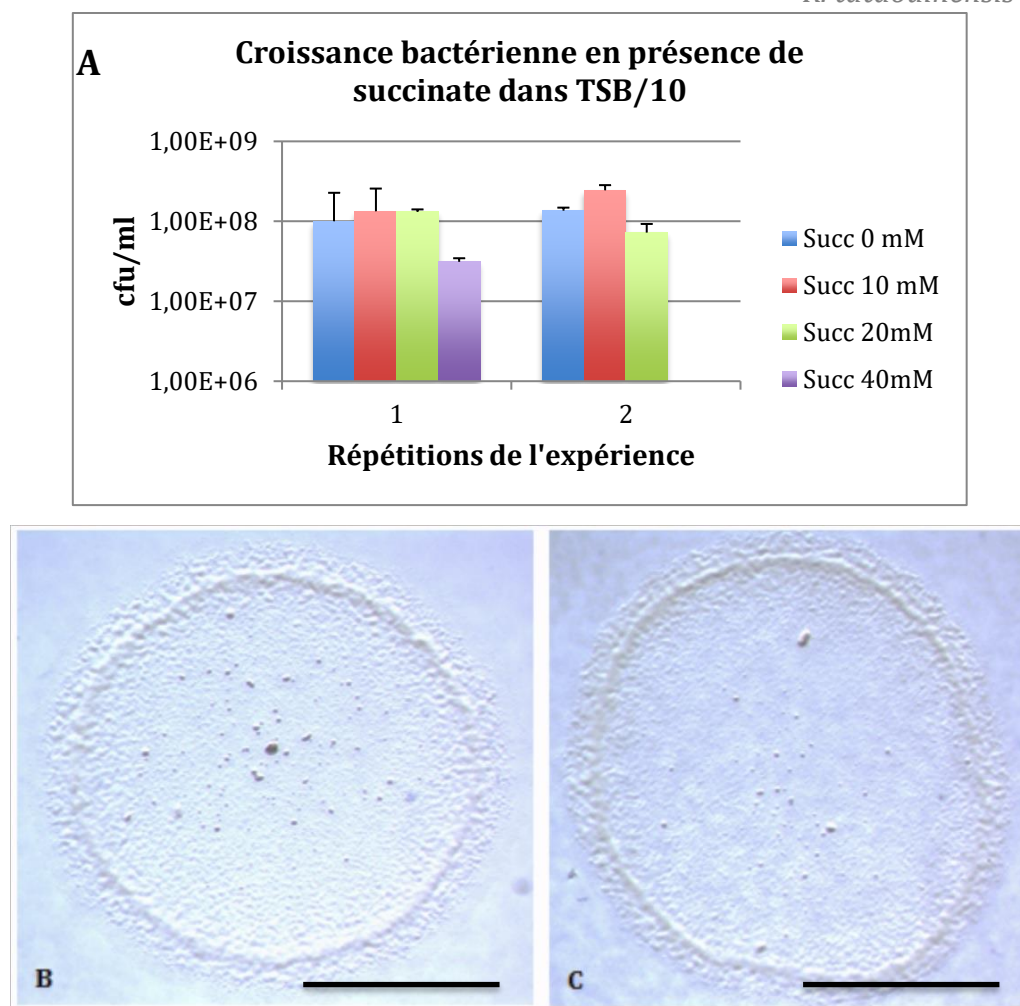


Figure 16 : Estimation de la croissance de Rta en présence de succinate : **A)** dans le milieu TSB/10 supplémenté avec du succinate 10, 20 et 40 mM (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j) par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. **B)** et **C)** dépôts de culture bactérienne en TSB/10 supplémenté avec du succinate 10 mM de sur le même milieu gélosé (TSA/10 + succinate 10 mM), provenant de deux cultures issues des répétitions incubées sous les mêmes conditions que les autres cultures dans TSB/10 + succinate 10 mM pendant 4 j. La croissance sur boîte de Petri est réalisée à l'obscurité à 30 °C pendant 4 j. Barre d'échelle : 4 mm

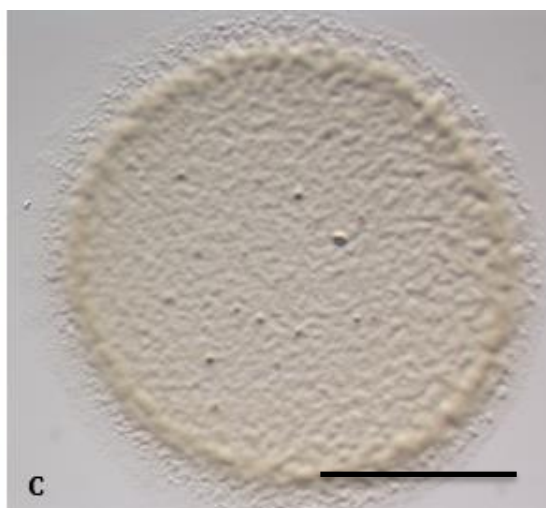
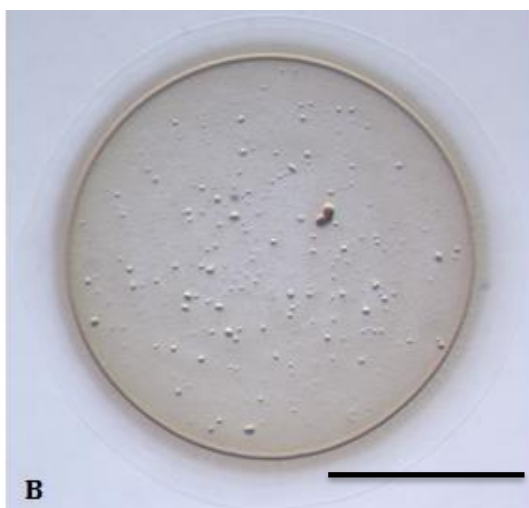
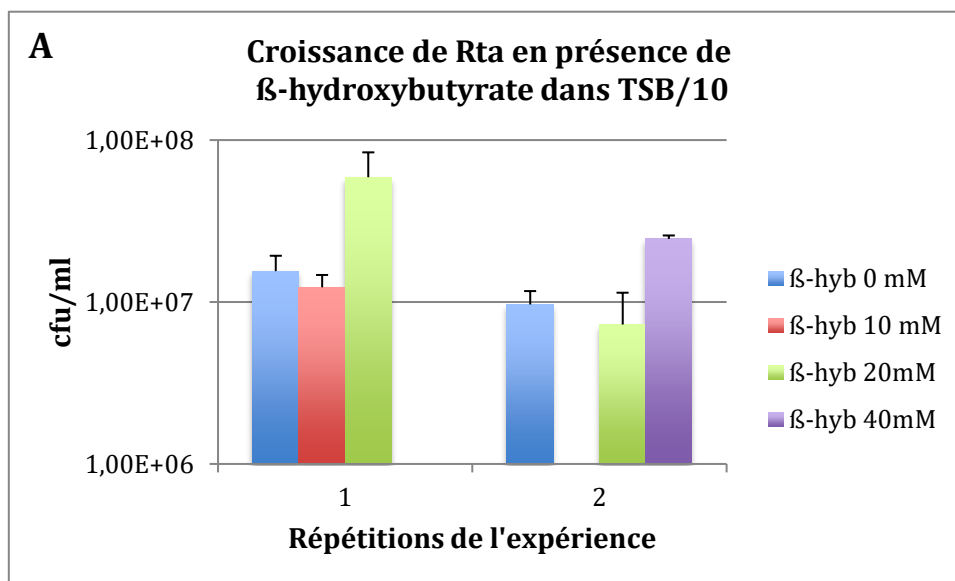
En conclusion, le succinate est une source de C et d'énergie ne convenant à l'optimisation de la production d'EPS par Rta.

3.1.1.4. Croissance de Rta dans le milieu TSB/10 + β -hydroxybutyrate

L'effet du β -hydroxybutyrate comme source de C additionné au milieu TSB/10 est variable d'une expérience à l'autre (Fig. 17A). Dans les deux expériences, l'addition de β -hydroxybutyrate stimule la croissance de Rta pour des concentrations supérieures à 20 mM. Les D.O. mesurées sur des répétitions différentes de celles utilisées pour les dénombrements, montrent une meilleure croissance dans TSB/10 supplémenté avec du β -hydroxybutyrate dès 10 mM. Les valeurs de D.O. moyennes sont de 0,17 pour des cultures avec du TSB/10 supplémenté avec 10 et 20 mM de β -hydroxybutyrate (pour rappel la D.O. moyenne de TSB/10 est 0,1). Les dépôts bactériens non-dilués sur le

même milieu gélosé, correspondants aux cultures dont les D.O. ont été mesurées (0,17), sont également plus développés et plus épais (Fig. 17B, C, D et E) par rapport au témoin (Fig. 14B et C). Une allure plus « muqueuse » de tout le dépôt est observée en comparaison avec le témoin, ce qui signifie que les cultures sont plus denses et contiennent également plus de kystes. Ces dépôts sont colorés en jaune-orange, mettant en évidence une augmentation de la production de caroténoïdes par les kystes.

En conclusion, le β -hydroxybutyrate est une source de C et d'énergie permettant la croissance de *Rta* et la formation des kystes.



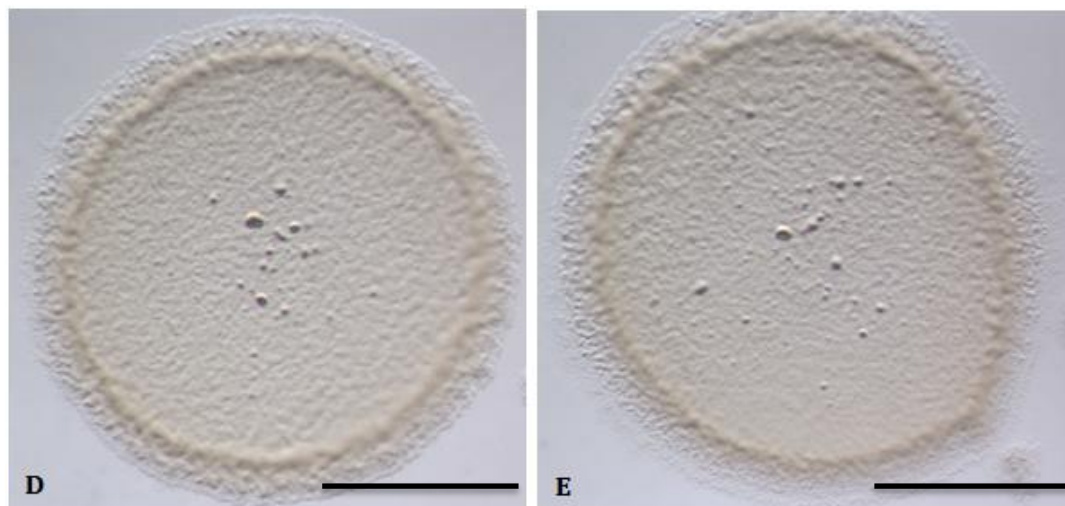


Figure 17 : Estimation de la croissance de Rta en présence de β -hydroxybutyrate : **A)** dans le milieu TSB/10 + β -hydroxybutyrate 10, 20 et 40 mM (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j) par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. **B)** et **C)** dépôts de culture bactérienne en TSB/10 + β -hydroxybutyrate 10 mM et **D)** et **E)** β -hydroxybutyrate 20 mM sur le même milieu gélifié (TSA/10 avec respectivement β -hydroxybutyrate 10 mM et 20 mM). B) et C), ainsi que D) et E), sont des dépôts de deux cultures issues des répétitions incubées dans les mêmes conditions que les autres cultures dans TSB/10 + β -hydroxybutyrate 10 mM et 20 mM pendant 4 jours. La croissance sur boîte de Petri est réalisée à l'obscurité à 30 °C pendant 4 jours. Barre d'échelle : 4 mm.

Nous avons observé, dans des expériences indépendantes, que les kystes et les bâtonnets peuvent présenter des colorations différentes. Ainsi, si des cultures constituées quasi uniquement de kystes et des cultures composées presque uniquement de bâtonnets sont centrifugées, les culots bactériens ont une intensité de couleur différente. Par exemple les cultures des mutants de Rta de hème-oxygénase ($\Delta RtHmuO$) et de bactériophytochrome-1 ($\Delta RtBphP1$) dans un milieu TSB/10 + 0,4 % NaCl, sont constitués respectivement quasiment uniquement de kystes ou de bâtonnets. Après la centrifugation de ces cultures, il est clairement observé une couleur blanchâtre des culots des cultures enrichies en bâtonnets de Rta $\Delta RtBphP1$ et une couleur jaune-orange des cultures enrichies en kystes de Rta $\Delta RtHmuO$ (Fig. 18). Donc, généralement les kystes ont une couleur plutôt jaune-orange et les bâtonnets ont une couleur plus blanchâtre.

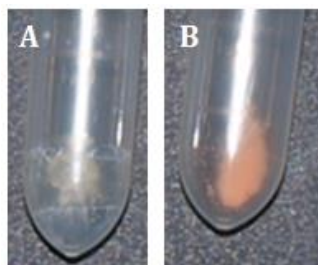


Figure 18 : Différenciation de couleur des kystes et des bâtonnets. **A)** Le culot de la culture de mutant de Rta de bactériophytochrome-1 ($\Delta RtBphP1$) qui est constituée quasiment uniquement de bâtonnets présente une couleur blanchâtre. **B)** Le culot de la culture de mutant de Rta de hème-oxygénase ($\Delta RtHmuO$) qui est constituée quasiment uniquement de kystes présente une couleur jaune-orange. A et B ont été incubés en milieu TSB/10 avec une concentration finale de NaCl 0,4 %, sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j.

3.1.1.5. Croissance de Rta dans le milieu TSB/10 + lactate

L'effet le plus remarquable et le plus reproductible a été observé en apportant du lactate au milieu TSB/10. La stimulation de la croissance est maximale à 10 mM de lactate et reste significative aux concentrations plus élevées (20 et 40 mM) (Fig. 19A). Cet effet mis en évidence par le comptage des cfu/mL est confirmé par la mesure des D.O. qui est doublée en présence de lactate 10 mM, atteignant une valeur moyenne de 0,19 (vs 0,10 dans TSB/10). Les dépôts bactériens non-dilués sur le même milieu gélosé, correspondants aux cultures dont la D.O. a été mesurée, se traduisent par une forte croissance, une allure très muqueuse et une couleur jaune-orange. Cela signifie qu'en présence de lactate, la croissance de Rta est stimulée avec également une forte proportion de kystes.

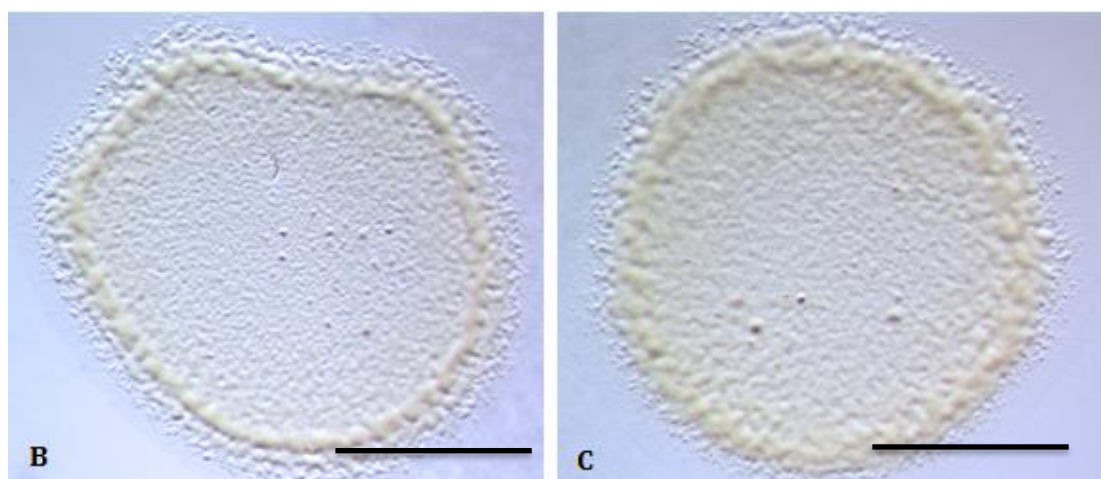
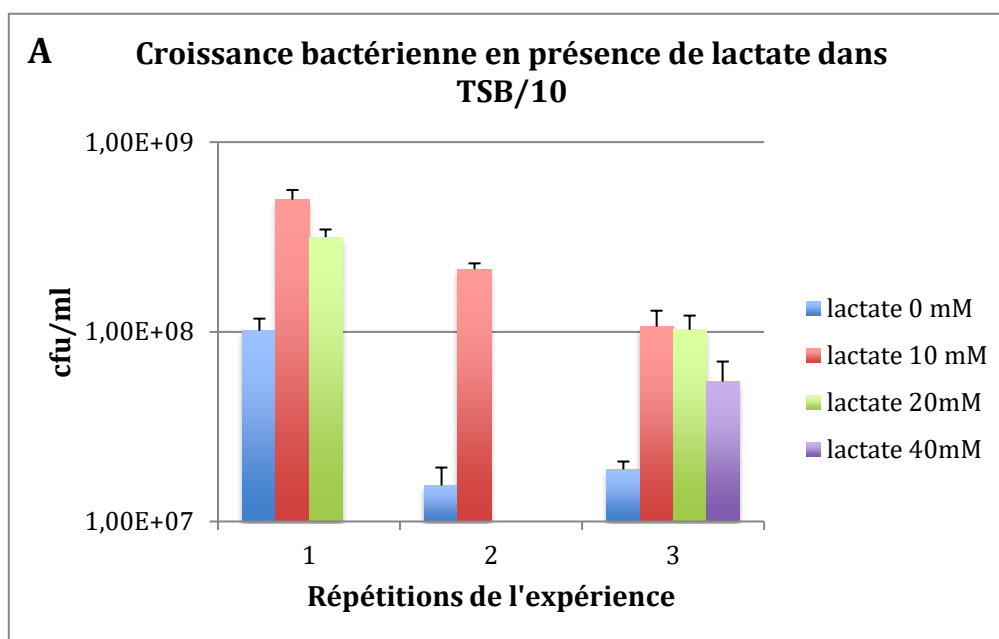


Figure 19 : Estimation de la croissance de Rta en présence de lactate : **A)** dans le milieu TSB/10 supplémenté avec du lactate 10, 20 et 40 mM (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. **B)** et **C)** dépôts de culture bactérienne en TSB/10 + lactate 10 mM sur le même milieu gélosé (TSA/10 + lactate 10 mM), provenant de cultures issues des répétitions incubées dans les mêmes conditions que les autres cultures dans TSB/10 + 10 mM lactate. La croissance sur boîte de Petri est réalisée à l'obscurité à 30 °C pendant 4 jours. Barre d'échelle : 4 mm

Pour confirmer ces résultats, une dernière expérience a été réalisée en comparant la masse de matière sèche des cultures de Rta dans TSB/10 et dans TSB/10 supplémenté avec 10 mM de lactate. Cette masse a été estimée en filtrant les cultures à 0,2 μm . Après la dessiccation, les filtres ont été pesés et la masse de matière sèche calculée. La quantification de la masse de matière sèche des cultures de Rta est la méthode la moins biaisée pour estimer la croissance bactérienne. Malgré tout, nous l'avons peu utilisée dans nos études en raison d'une centrifugation incomplète des bâtonnets de Rta et du fait que globalement la méthode est plus longue comparée aux autres (comptage et mesure de D.O.). Dans le cas de la comparaison de la croissance entre TSB/10 et TSB/10 supplémenté avec du lactate 10 mM, il est important de réussir cette expérience nonobstant sa complexité, étant donné que l'acide lactique est une bonne piste non seulement comme substrat carboné mais également pour la régulation du pH dans les cultures en fed-batch.

Les cultures de Rta dans le milieu TSB/10 ont une D.O. en moyenne de 0,06 et une masse de matière sèche moyenne de 4,8 mg (pour 150 mL). Celles supplémentées avec du lactate 10 mM ont une D.O. en moyenne de 0,15 et une masse de matière sèche moyenne de 10,8 mg. Donc encore une fois, la croissance bactérienne, selon les deux méthodes (D.O. et biomasse sèche), est environ 2 fois plus importante dans les cultures supplémentées avec du lactate 10 mM par rapport au témoin sans lactate (Fig. 20). De plus ces résultats montrent que la mesure de la D.O. comme méthode d'estimation de la croissance bactérienne est fiable et proportionnelle à celle de la masse de matière sèche.

En conclusion, le lactate est une source de C et d'énergie permettant la croissance de Rta et la formation des kystes.

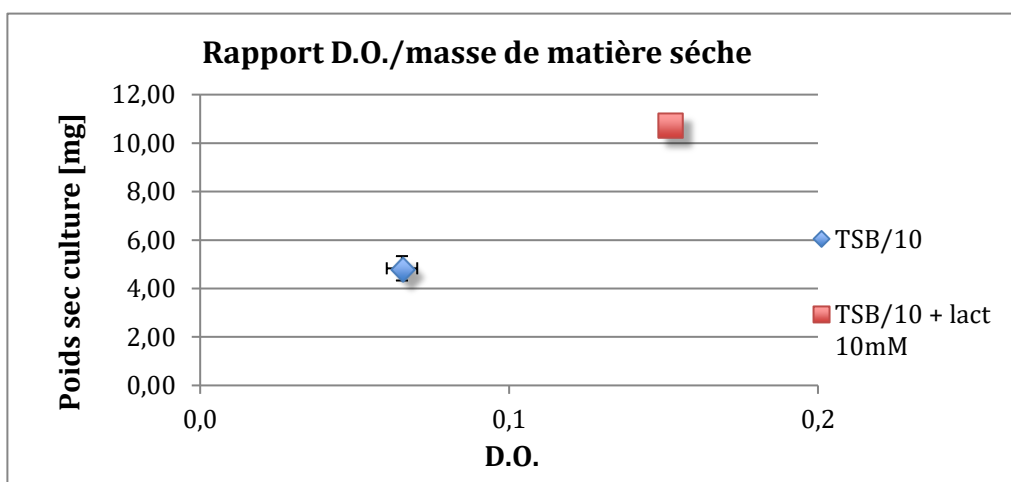


Figure 20 : Corrélation entre la masse de matière sèche moyenne et la mesure de D.O. (600 nm) pour estimer la croissance de Rta dans deux conditions de culture : milieu TSB/10 avec ou sans de lactate 10 mM. Cultures en batch de 150 mL, sous agitation à 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j. L'inoculum a été fait avec une culture de Rta dans TSB/10 de 10^5 - 10^6 cfu/mL (concentration finale dans le milieu de culture). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

En **conclusion** de cette partie consacrée à la recherche d'un substrat carboné permettant une croissance de Rta supérieure à celle obtenue avec le milieu de référence (TSB/10), nous avons mis en évidence que l'acétate bien que métabolisé par Rta ne permet pas une stimulation de sa croissance en présence de TSB/10 et dans nos

conditions expérimentales. Il a été également montré que le succinate est métabolisé sans avoir d'effet significatif sur la croissance de *Rta*. Nous confirmons que le β -hydroxybutyrate est une source de C pour *Rta*. La principale conclusion est qu'en présence de lactate (10 mM soit 0,9 g/L) la croissance de *Rta* est quasiment doublée par rapport au témoin TSB/10 et que la culture bactérienne est potentiellement riche en kystes en division. Dans la mesure où le lactate est une source de C peu coûteuse, et donc compatible industriellement, **c'est le lactate qui sera utilisé dans nos travaux sur l'optimisation de la croissance de *Rta* et de sa production d'EPS en conditions de fed-batch dans les bioréacteurs** (cf. paragraphe 3.2., chapitre 1).

3.1.2. Croissance bactérienne en présence des carbonates

R. tataouinensis TTB310 possède les gènes codant les enzymes nécessaires au fonctionnement de la voie autotrophe du "dicarboxylate/hydroxybutyrate". Cette voie permet l'incorporation de deux molécules de CO₂ sur une molécule d'acétate (C2) en donnant une molécule d'oxaloacétate (C4). Elle possède en particulier la première enzyme qui catalyse la transformation d'acétate en acétyl-CoA (acétate-CoA ligase, *Rta_15940*) (de Luca *et al.*, 2011). D'autre part, *Rta* possède le gène codant la PEP-carboxylase (*Rta_28690*) qui catalyse l'ajout d'un anion bicarbonate HCO₃⁻ à une molécule de phosphoénolpyruvate (C3) pour former une molécule d'oxaloacétate (C4). Cette capacité de régénérer l'oxaloacétate est particulièrement importante pour le fonctionnement du cycle du glyoxylate (glyoxylate bypass), dont *Rta* possède les gènes codant pour les deux enzymes nécessaires à son fonctionnement (malate synthase, *Rta_02700*; isocitrate lyase, *Rta_23660*). Ce "glyoxylate bypass" permet d'éviter deux décarboxylations du cycle de l'acide citrique et se trouve fréquemment associé aux microorganismes capables de croître en présence d'acétate comme source de C (Ramos-Vera *et al.*, 2010).

Ainsi il nous a semblé logique, après avoir testé l'effet de l'acétate sur la croissance, de tester l'hypothèse selon laquelle le CO₂ pourrait être un facteur limitant de la croissance de *Rta*. Dans le but d'optimiser les conditions de culture, cette hypothèse a été testée en rajoutant trois types de carbonates – carbonate de sodium, de potassium et de calcium. Dans les expériences suivantes, le milieu TSB/10 a été supplémenté ou pas (témoin) avec de l'acétate (cf. la voie autotrophe dicarboxylate/hydroxybutyrate) ou du succinate (C4 intermédiaire du cycle de l'acide citrique). Bien que n'ayant pas de rapport avec la possibilité d'utiliser le CO₂ ou le carbonate, nous avons testé également le lactate en raison des résultats décrits précédemment montrant l'intérêt de cette source de C pour optimiser la croissance de *Rta*. Les concentrations en carbonates sont de 0, 5, 10 et 15 mM. Il faut noter que seulement le KCO₃ et le NaHCO₃ sont solubles, tandis que CaCO₃ est insoluble, mais pouvant être éventuellement solubilisé au cours de la croissance par *Rta*.

En présence de K₂CO₃ 5 mM, la croissance de *Rta* dans un milieu TSB/10 supplémenté ou pas avec du lactate 10 mM est fortement diminuée d'un facteur 100 par rapport au témoin sans K₂CO₃. Aux concentrations supérieures de K₂CO₃ (10 et 15 mM), plus aucune croissance de *Rta* n'est observée.

Concernant l'effet de CaCO₃, nous avons tout d'abord confirmé que le succinate ajouté au milieu TSB/10 ne stimule pas la croissance de *Rta* (Fig. 21). Par contre, l'ajout de faibles concentrations de CaCO₃ (5 et 10 mM) stimule de façon significative la croissance de *Rta* en présence de succinate aux concentrations de 20 et 40 mM (Fig. 21). Cet effet n'est pas confirmé dans une seconde expérience indépendante, dans laquelle la

croissance du Rta dans le milieu TSB/10 supplémenté de 10 et 20 mM de succinate est identique ou plus importante que celle dans les mêmes milieux additionnés de 5 mM CaCO_3 (Fig. 22). Dans cette même expérience, nous observons que l'addition de CaCO_3 5 mM avec de l'acétate 10 mM n'a aucun effet sur la croissance de Rta.

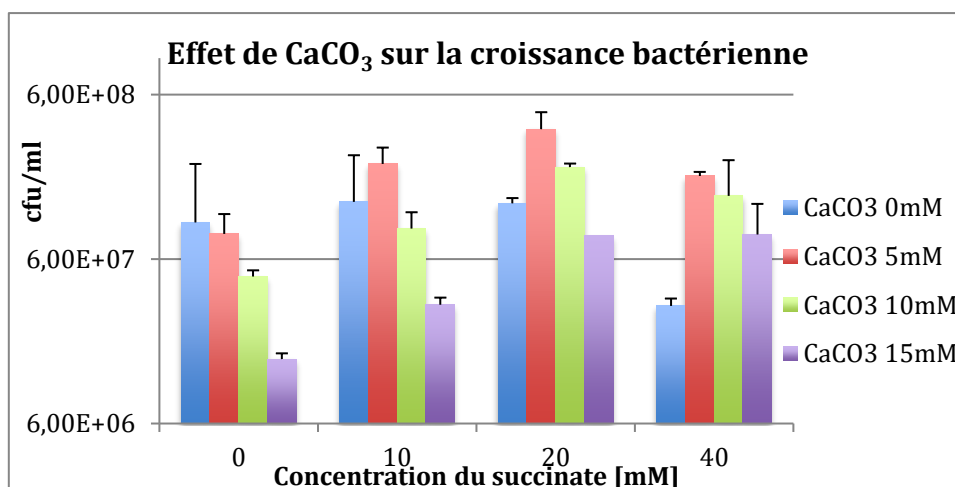


Figure 21 : Effet de CaCO_3 sur la croissance bactérienne dans milieu TSB/10 en présence de 10, 20 et 40 mM de succinate par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

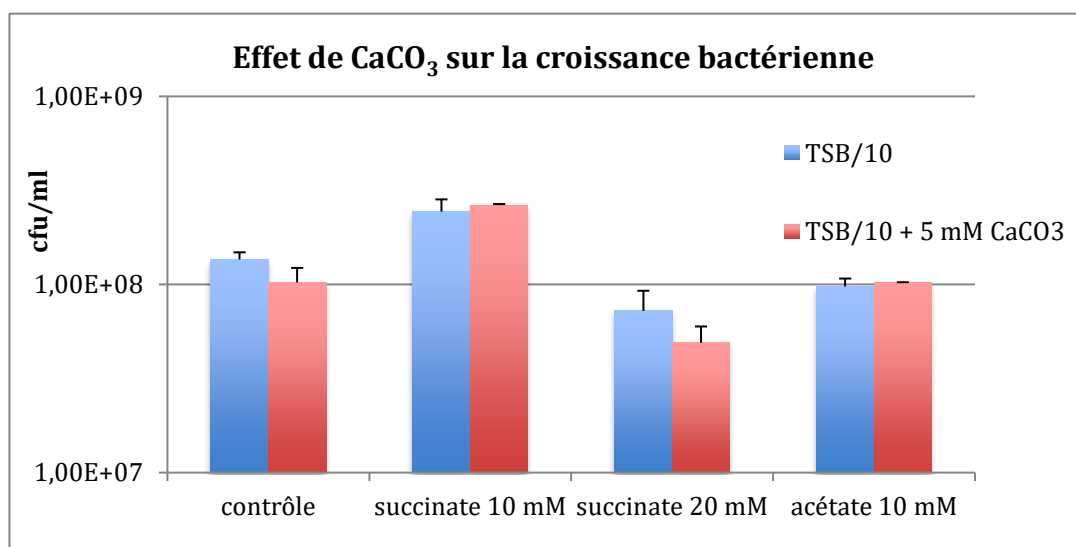


Figure 22 : Effet de CaCO_3 5 mM sur la croissance bactérienne dans milieu TSB/10 en présence de succinate 10 et 20 mM ou d'acétate 10 mM par comptage des (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Enfin, comme attendu, quand la source de C est le lactate, ni CaCO_3 (5 mM), ni NaHCO_3 (de 5, 10 ou 15 mM) n'a d'effet de stimulation de la croissance de Rta (Fig. 23).

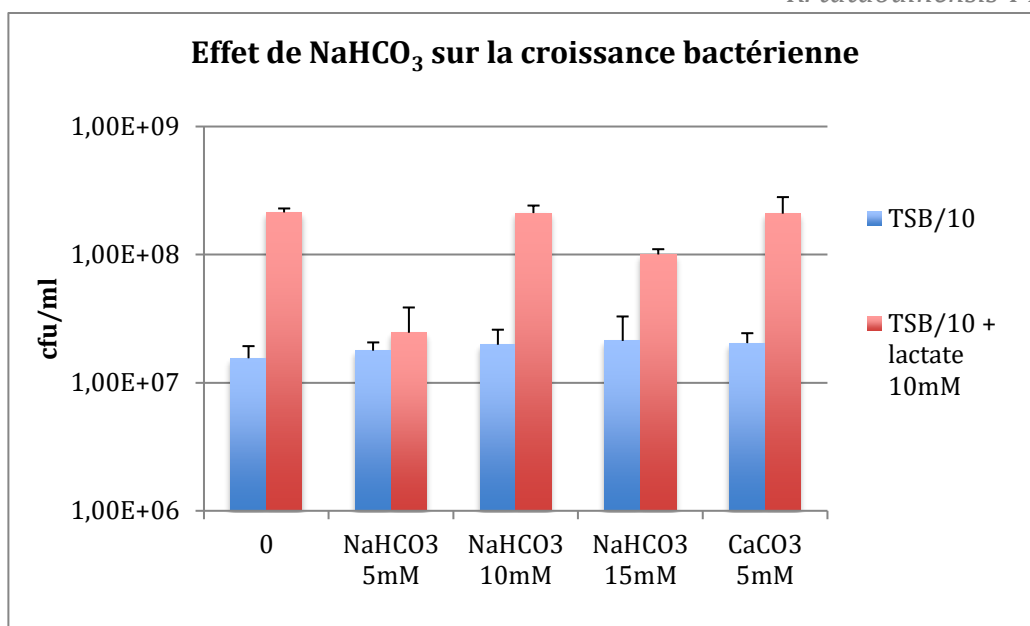


Figure 23 : Effet de NaHCO_3 (5, 10 et 15 mM) et CaCO_3 (5 mM) sur la croissance bactérienne dans milieu TSB/10 + lactate 10 mM, par comptage des cfu/mL (inoculum : environ 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

En conclusion de cette partie consacrée à l'effet des trois formes de carbonate, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un effet positif de CaCO_3 avec de l'acétate comme source de C, alors qu'en présence de succinate le CaCO_3 pourrait avoir un effet positif sur la croissance de *Rta*. Comme prévu, avec le lactate comme source de C, ni CaCO_3 ni NaHCO_3 ne stimule la croissance de *Rta* et nous ne tirerons donc aucun avantage de l'addition de carbonate pour stimuler la production de biomasse de *Rta* en présence de lactate dans les expériences réalisées en fed-batch (cf paragraphe 3.2, chapitre 1). Enfin il est plausible que l'absence d'effet de CaCO_3 soit dû au fait que *Rta* alcalinise le pH pendant sa croissance (c.f. paragraphe 3.2.2., chapitre 1) et pour la solubilisation de ce composant il aurait fallu imposer un pH acide. Il serait intéressant de tester alors la croissance en présence de CaCO_3 ou NaHCO_3 et d'acétate 10 mM en contrôlant le pH pour vérifier si vraiment ces composants n'ont pas d'effet.

3.1.3. Croissance de *Rta* en fonction de la pression osmotique

Pour poursuivre l'optimisation de la croissance de *Rta* et sa production d'EPS, sa croissance a été testée en réponse à la pression osmotique. Pour optimiser la croissance bactérienne il est important de contrôler la concentration des solutés pour permettre de réguler le potentiel membranaire et l'équilibre osmotique des cellules. En effet, la pression osmotique est souvent un facteur limitant pour la croissance bactérienne dans les milieux naturels et dans des conditions de production industrielle (Kramer, 2010). Un changement de pression osmotique peut affecter immédiatement le volume et la forme cellulaire des bactéries (Kramer, 2010) ce qui est particulièrement important dans le cas de *Rta* qui doit répondre aux variations de la pression osmotique surtout sous sa forme de bâtonnet. Certaines souches bactériennes sont connues pour répondre à une augmentation de la pression osmotique du milieu en stimulant la synthèse de leur EPS (Schneider-Keel *et al.*, 2001 ; Ionescu et Belkin, 2009). D'un autre point de vue les bactéries capables de croître en conditions de forte pression osmotique sont intéressantes dans un contexte de production industrielle car dans ces conditions la

contamination de ces cultures est plus difficile. La pression osmotique affecte également les fonctions physiologiques et finalement la croissance bactérienne. En particulier dans les milieux industriels, la pression osmotique élevée peut être due à la fois à une concentration élevée des nutriments et sels et à l'accumulation extracellulaire des produits métaboliques sécrétés au cours de la croissance. Ce problème est aggravé pour les cultures bactériennes en batch qui s'accompagnent de changements de pH nécessitant d'utiliser des systèmes tampons et/ou d'ajouter des bases/acides pour réguler le pH, ce qui se traduit par une augmentation de la force ionique du milieu de culture.

Prenant en compte l'importance de l'effet de la pression osmotique sur le développement bactérien et la production d'EPS, nous avons voulu évaluer la tolérance de Rta à des pressions osmotiques générées par du saccharose et des sels. Les résultats obtenus pourront être très utiles dans la poursuite de l'optimisation de milieu de culture et le choix des systèmes tampons. Dans ces expériences, par souci d'homogénéité avec les résultats précédents, nous avons choisi d'évaluer l'effet de ces composés sur la croissance de Rta dans le milieu TSB/10.

3.1.3.1. Effet du saccharose sur la croissance

Le saccharose peut être un très bon substrat, fournissant deux monosaccharides pour la synthèse de fructanes et d' α -glucanes chez *Bacillus sp.*, *Zymomonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Gluconacetobacter sp.*, *Leuconostoc sp.* (cf paragraphe 2.1., synthèse bibliographique). Il peut être également un substrat carboné qui favorise la synthèse intracellulaire, puis la sécrétion d'EPS comme par exemple chez *Klebsiella sp.* et *Cronobacter sakazakii* (Quang *et al.* 2013 ; Jung *et al.*, 2013). Dans le cas de Rta, nous avons choisi le saccharose pour modifier la pression osmotique du milieu, sachant que ce disaccharide ne peut pas être utilisé comme une source de carbone par Rta (Heulin *et al.*, 2003).

Nous avons observé qu'en présence de saccharose, la croissance bactérienne est légèrement plus faible à 2 g/L par comparaison avec le témoin TSB/10 et significativement inhibée à plus forte concentration (5 g/L) (Fig. 24). Les valeurs de D.O. mesurées en présence de 2 et 5 g/L de saccharose (0,09) sont également légèrement moins importantes par rapport au témoin TSB/10 (0,1). Les dépôts des cultures non diluées sur le milieu gélosé correspondant aux cultures, dont les D.O. étaient mesurées, confirment les résultats des dénombrements. Les profils des dépôts sur TSA/10 supplémenté de 2 g/L saccharose (Fig. 24B et C) sont identiques à ceux obtenus sur TSA/10 (Fig. 14B et C), et ceux sur TSA/10 supplémenté de 5 g/L de saccharose sont moins denses (Fig. 24 D et E) identiques à ceux des dépôts sur TSA/10 supplémenté d'acétate 10 mM (Fig. 15 B et C). Une nouvelle caractéristique est le bord plus distinctif du dépôt sur TSA/10 supplémenté de 5 g/L de saccharose par rapport au témoin (Fig. 14B et C), pouvant s'interpréter comme une forte production de kystes en périphérie du dépôt.

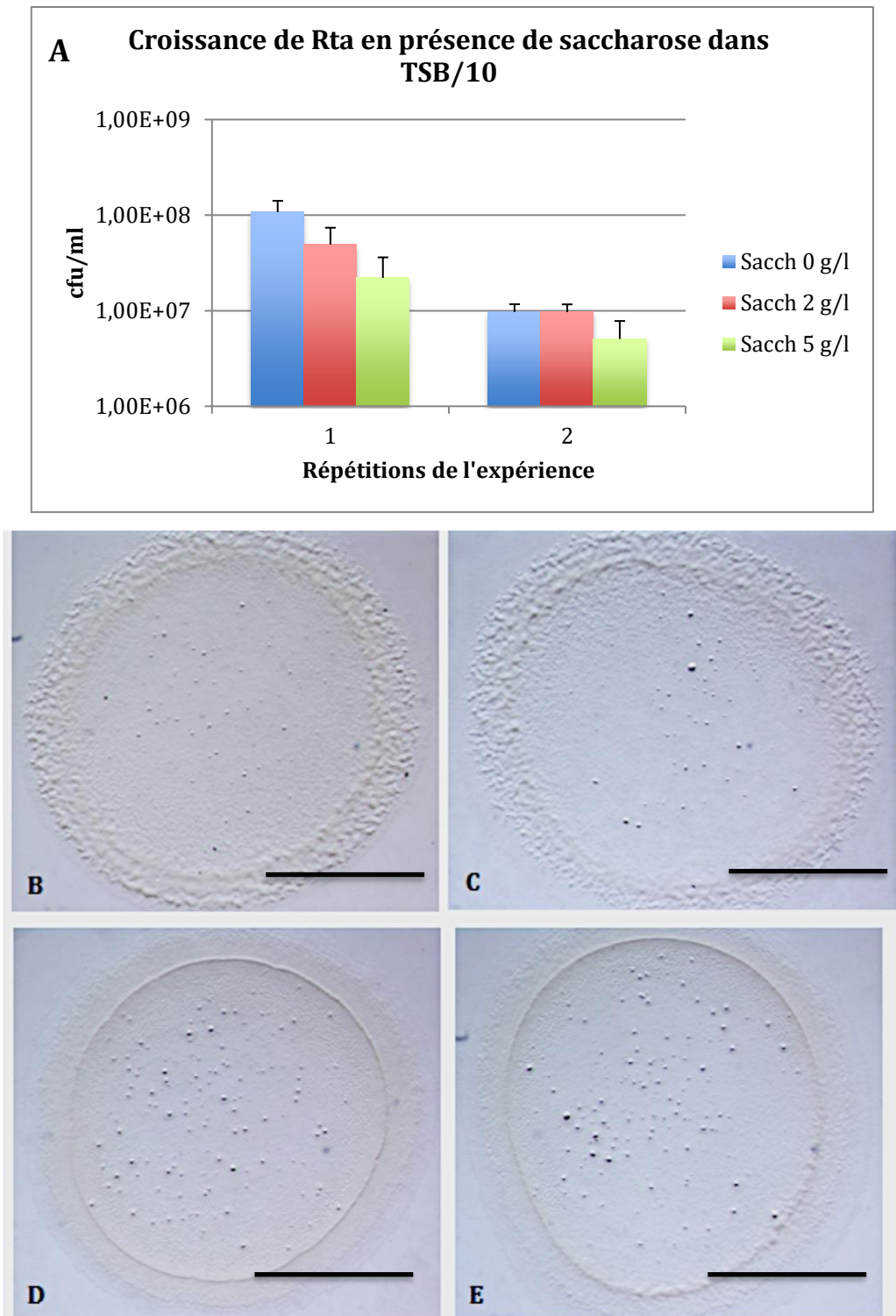


Figure 24 : Estimation de la croissance de Rta en présence de saccharose : **A)** dans le milieu TSB/10 supplémenté avec 2 et 5 g/L saccharose (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) par comptage des cfu/mL (inoculum : 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. **B)** et **C)** dépôts de culture bactérienne en TSB/10 supplémenté avec de saccharose 2 g/L et **D)** et **E)** saccharose 5 g/L sur le même milieu gélosé (TSA/10 avec respectivement 2 et 5 g/L de saccharose). Barre d'échelle : 4 mm

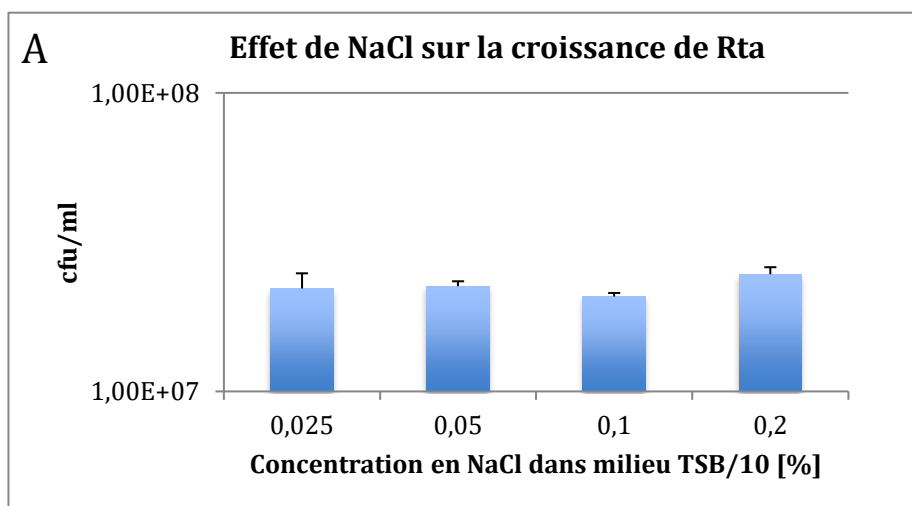
Le saccharose a un effet inhibiteur sur la croissance de Rta pouvant s'interpréter comme un stress osmotique chez une bactérie incapable de métaboliser ce disaccharide,

sans toutefois avoir observé de modification sur la forme des bâtonnets et encore moins des kystes (observations au microscope).

Par contre il est connu que, pour des bactéries capables de métaboliser le saccharose et surtout celles qui le transforment en EPS (lévanes, inulins, dextranes, alternans, mutans, reuterans), cette pression osmotique est tolérée à des concentrations encore plus élevées de ce disaccharide. En effet des concentrations de 10 et 20 g/L de saccharose sont habituellement utilisées dans les milieux de culture des bactéries productrices d'EPS comme *Pseudomonas* sp. et *Arthrobacter* sp. (Bueno et Garcia-Cruz, 2006). Le milieu de culture d'*Azotobacter vinelandii* pour la production d'EPS peut contenir jusqu'à 40 g/L de saccharose (Brivonese et Sutherland, 1989). Certaines souches d'*E. coli* sont capables de tolérer 20 g/L de saccharose (Sabri et Nielsen, 2013).

3.1.3.2. Tolérance à la force ionique

Dans la mesure où de nombreuses espèces bactériennes isolées à partir des sols désertiques ou semi-désertiques ont été décrites comme étant capables de tolérer des concentrations élevées en NaCl (Reddy et Garcia-Pichel, 2009 ; Reddy et Garcia-Pichel, 2005 ; Hussain *et al.*, 2016 ; Montero-Calasanz *et al.*, 2013), nous avons fait l'hypothèse que Rta, elle aussi isolée d'un milieu semi-désertique, pouvait posséder cette propriété. En conditions de laboratoire, Rta est cultivée dans le milieu TSB/10, dont la concentration en NaCl est 0,05 %. Sa faible croissance dans TSB/10 pourrait être due à une pression osmotique non adaptée. Pour vérifier cette hypothèse, dans une première expérience, nous avons sélectionné des valeurs de concentrations en NaCl encadrant celle de TSB/10 (Fig. 25A). Le comptage des bactéries (cfu/mL), tout comme les observations au microscope, permet de mettre en évidence que Rta tolère jusqu'à 0,2 % de NaCl. Dans la seconde expérience, les concentrations en NaCl ont été augmentées jusqu'à 0,5 % (Fig. 25B) permettant de mettre en évidence qu'au-delà 0,3 % de NaCl, la croissance de Rta est diminuée, significativement inhibée à 0,5% (Fig. 25B) et totalement inhibée à 0,8 % de NaCl (résultat non présenté).



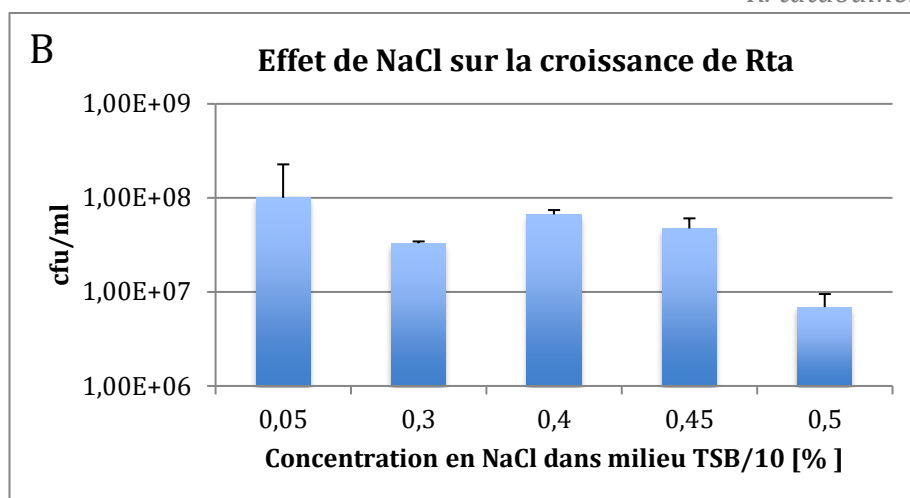
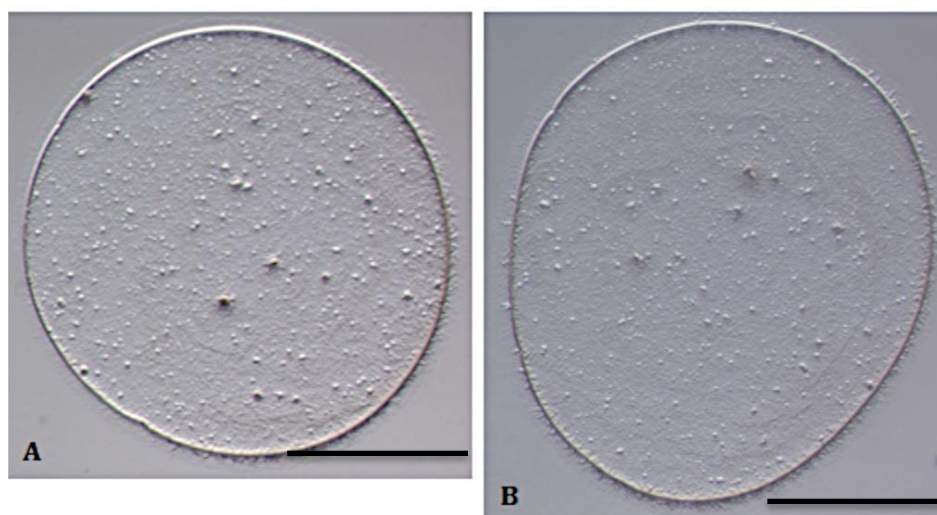


Figure 25 : Croissance de Rta en réponse à des concentrations croissantes en NaCl (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) par comptage des cfu/mL (inoculum : environ 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). **A)** Concentrations proches de celle dans TSB/10 (de 0,025 % à 0,2 %). **B)** Concentrations plus élevées que celle dans TSB/10 (de 0,3 à 0,5 %). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

L'observation macroscopique des dépôts sur TSA/10 + 0,3 % NaCl de Rta cultivée dans TSB/10 en présence de 0,3 % NaCl confirme que la culture est moins dense et moins muqueuse (Fig. 26A et B) que celle du milieu témoin (TSB/10, Fig. 14B et C). De nouveau, on observe une périphérie épaisse autour des dépôts. L'effet de NaCl sur la croissance de Rta est encore plus marqué en observant les dépôts des cultures TSB/10 + 0,4 % NaCl sur le même milieu de culture gélosé. Dans ces conditions, le développement de Rta est significativement inhibé. Le dépôt se traduit par un développement sous forme de petites colonies isolées et pas comme un tapis bactérien (Fig. 26C et D).



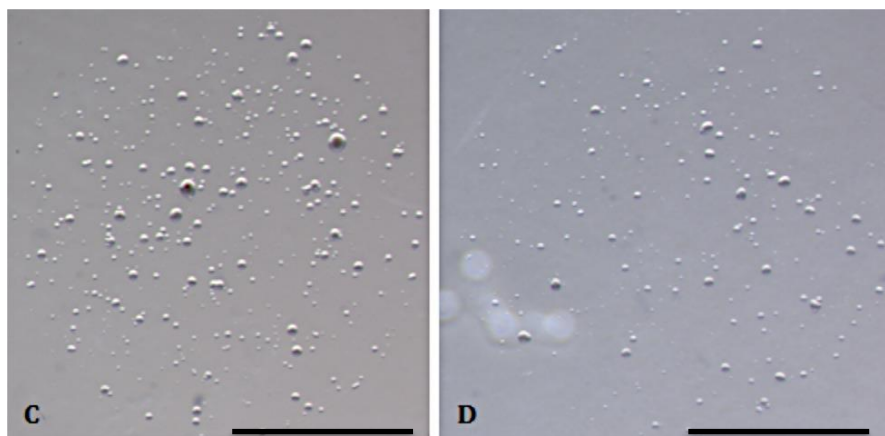


Figure 26 : Croissance de Rta en réponse à NaCl. **A)** et **B)** Allure des dépôts sur TSA/10 supplémenté avec 0,3 % NaCl de cultures de Rta cultivées dans TSB/10 + NaCl 0,3 %, **C)** et **D)** Allure des dépôts sur TSA/10 supplémenté avec 0,4 % NaCl de cultures de Rta TSB/10 + NaCl 0,4 %, A et B, ainsi que C et D, sont des dépôts de deux cultures issues des répétitions incubées sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours. La croissance sur boîte de Petri est réalisée à l'obscurité à 30 °C pendant 4 jours. Barre d'échelle : 4 mm

Ces résultats sont surprenants puisque que, comme déjà évoqué, des bactéries isolées de sols désertiques comme *Dyadobacter crusticola*, *Deinococcus saudensis* et *Geodermatophilus normandii* sont capables de résister à des concentrations en NaCl allant jusqu'à 1 % (Reddy et Garcia-Pichel, 2009 ; Hussain *et al.*, 2016 ; Montero-Calasanz *et al.*, 2013). D'autres bactéries du désert, comme *Patulibacter americanus*, tolèrent des concentrations en NaCl allant jusqu'à 3% (Reddy et Garcia-Pichel, 2005).

Pour compléter cette étude sur la tolérance de Rta à la force ionique, nous avons également testé l'effet de KCl, car il a été décrit que certaines espèces bactériennes comme *Lactobacillus pentosus* et *Listeria monocytogenes* tolèrent mieux KCl que NaCl (Bautista-Gallego *et al.*, 2008 ; Zarei *et al.*, 2012). Rta semble effectivement mieux tolérer KCl dans la mesure où, en présence de KCl 0,4 %, la croissance de Rta est légèrement mais significativement stimulée par rapport au témoin à KCl 0,05 % (Fig. 27), alors qu'à cette concentration en NaCl la croissance de Rta était diminuée (Fig. 25B). Par contre à plus forte concentration (KCl 0,6 %), la croissance de Rta est de nouveau fortement inhibée (facteur 10^3 , Fig. 27).

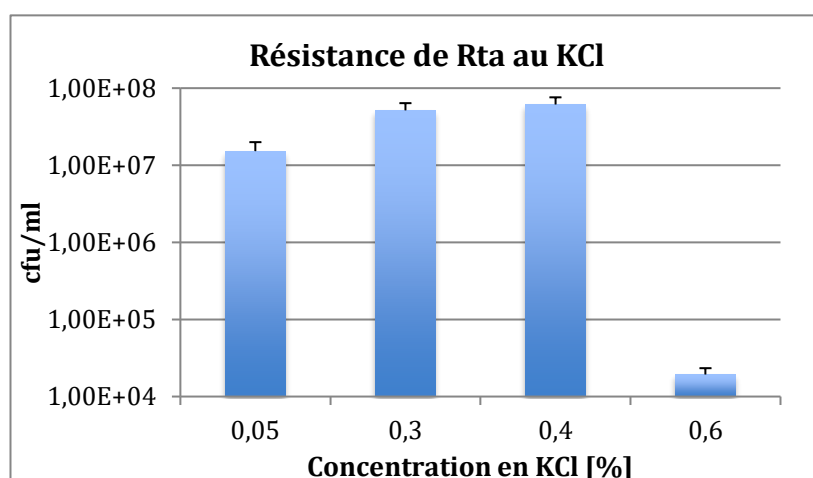


Figure 27 : Tolérance de Rta aux différentes concentrations en KCl ajoutées au milieu TSB/10 (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) par comptage des cfu/mL

(inoculum : environ 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Deux autres expériences supplémentaires ont permis de confirmer que Rta a une faible tolérance à la force ionique. La première a consisté à tester la croissance de Rta en présence de concentrations croissantes de NH_4Cl (de 0,2 à 1 %) dans le milieu TSB/10. Dans ces conditions, un développement bactérien est observé seulement en présence de 0,2 % NH_4Cl . Au-delà, sa croissance est inhibée.

La seconde expérience a permis d'observer la croissance de Rta dans le milieu TSB/10 dont le pH a été ajusté à différentes valeurs avec NaOH ou HCl. Les résultats montrent que la croissance de Rta est plus faible à la fois quand le pH est plus bas (6,5 et 7,0) ou plus haut (8,0 et 8,5), suggérant que les sels formés par l'ajout de NaOH ou HCl ont modifié la force ionique (Fig. 28).

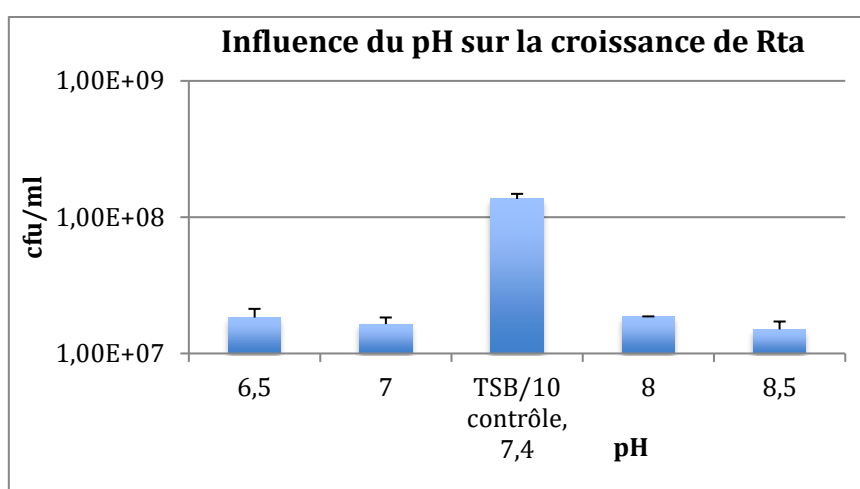


Figure 28 : Croissance de Rta dans un milieu TSB/10 ajusté à différentes valeurs du pH (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 jours) par comptage des cfu/mL (inoculum : environ 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

En conclusion, Rta présente une très faible tolérance à la pression osmotique créée par un apport de saccharose ou de sels de sodium et de potassium. Nous avons remarqué que cela pouvait être gênant pour l'utilisation de systèmes tampons et même pour l'ajustement du pH dans une culture en fed-batch. Donc, il faudra trouver d'autres stratégies pour l'ajustement du pH qui n'impliquent pas l'utilisation habituelle d'acides et de bases dilués, comme H_2SO_4 et NaOH lors des cultures en fed-batch.

3.1.3.3. Effet de la concentration de NaCl sur le ratio « kystes/bâtonnets »

Nous nous sommes intéressés à l'effet de NaCl sur le taux d'enkystement de Rta. Pour cela nous avons utilisé le milieu TSB/10 supplémenté avec du lactate 10 mM. Les expériences ont mis en évidence une très nette augmentation de l'enkystement en ajoutant du NaCl à une concentration finale 0,4 % en phase exponentielle (troisième jour de culture en milieu TSB/10 supplémenté avec du lactate 10 mM). Au cinquième jour de culture, l'enkystement est significativement plus important (x3 par rapport au témoin TSB/10 + lactate 10 mM) (Fig. 29).

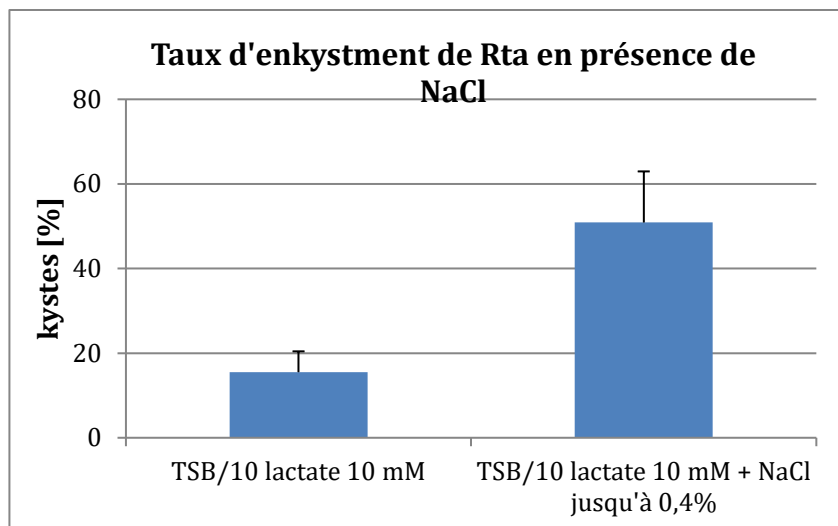


Figure 29 : Taux d'enkystement de Rta dans TSB/10 + 10 mM lactate au cinquième jour de culture, en présence ou non de NaCl 0,4 % ajouté en début de phase exponentielle (au troisième jour de culture). L'estimation est faite par un dénombrement sous microscope des kystes et bâtonnets. L'incubation des cultures est faite sous agitation 150 rpm, à 30 °C. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

En conclusion, nous avons montré qu'en présence de NaCl (0,4 %) il était possible d'augmenter de façon importante le taux d'enkystement de Rta (50 %), dans un milieu TSB/10 + lactate 10 mM. Malgré ce résultat intéressant, cette condition de culture n'a pas été utilisée dans les cultures en fed-batch en raison d'une mise à point difficile à cette échelle. Nous avons découvert une stratégie plus simple et rapide d'obtention des cultures enrichies en kystes, incluant un milieu optimisé et un temps de culture plus court. Ce résultat a été valorisé dans le troisième chapitre.

3.1.4. Croissance bactérienne en fonction de la concentration en caséine, peptone et d'extrait de levure

La composition du milieu TSB/10 comprend de l'extrait de soja contenant un très grand nombre de cofacteurs de croissance. D'un point de vue industriel ce composant est relativement coûteux et mériterait d'être remplacé. Le choix le plus raisonnable pour remplacer cet extrait de soja est l'extrait de levure. Nous avons substitué l'extrait de soja (0,3 g/L) par quatre concentrations différentes en extrait de levure (de 0,1 à 0,5 g/L), le pH de chaque condition étant ajusté à 7,4. Les résultats montrent que l'augmentation de la concentration en extrait de levure n'a pas d'effet positif sur la croissance de Rta (Fig. 30), et que la densité bactérienne obtenue en présence de 0,1 g/L d'extrait de levure est équivalente à celles que nous avons obtenues dans les expériences précédentes avec un milieu TSB/10 (contenant 0,3 g/L de peptone de caséine) et qui varient, selon les expériences, de 10^7 à 10^8 cfu/mL (Fig. 23A).

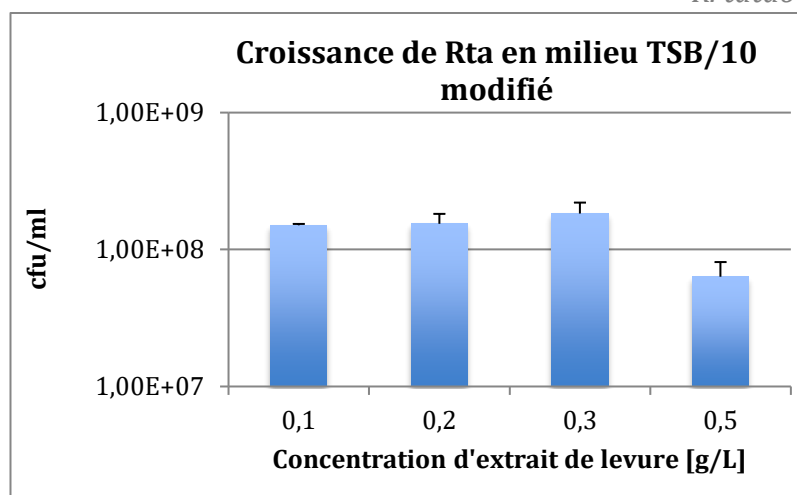


Figure 30 : Dénombrement bactérien de Rta développé dans milieu TSB/10 modifié, où l'extrait de soja a été remplacé par de l'extrait de levure (de 0,1 à 0,5 g/L) par comptage des cfu/mL (inoculum : environ 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai).. L'incubation des cultures est faite sous agitation 150 rpm, à 30 °C, pendant 3 jours. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Après avoir montré qu'il était possible de remplacer la peptone de farine de soja par de l'extrait de levure, nous avons voulu voir dans quelle mesure la concentration de fraction "peptone de caséine" contenue dans le milieu TSB/10 (1,7 g/L) pouvait être diminuée sans affecter la croissance de Rta. Pour cela, nous avons reconstitué un milieu TSB/10-like avec des concentrations variables d'extrait de levure (0,1 à 0,4 g/L), de peptone de caséine (de 0 à 1,5 g/L) et remplacé le dextrose par du lactate 10 mM (Fig. 31).

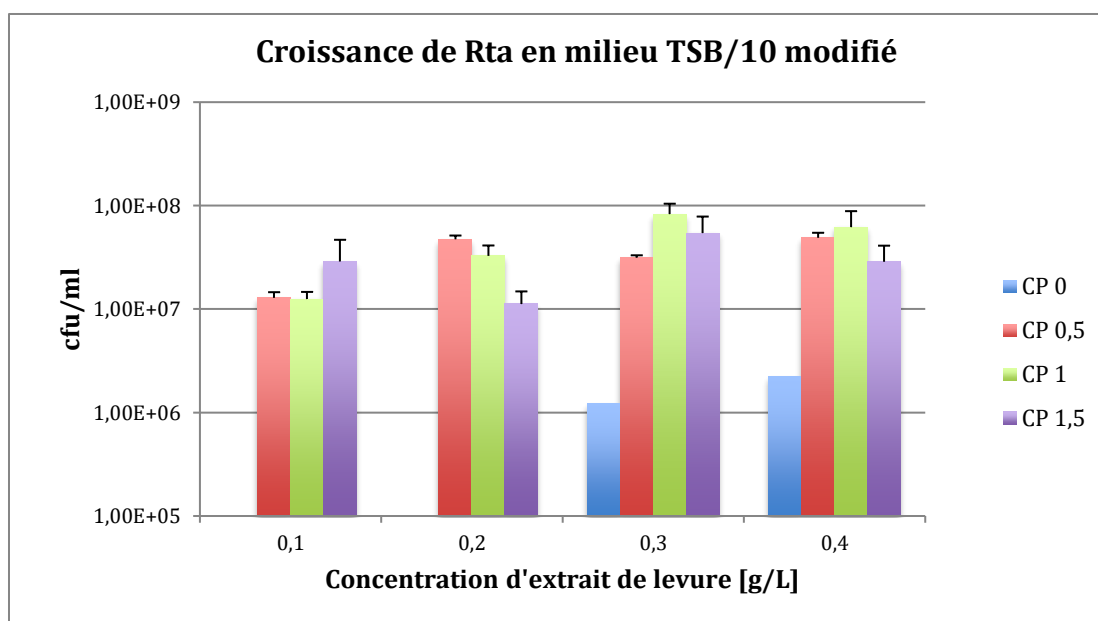


Figure 31 : Croissance de Rta dans milieu de culture TSB/10 modifié, avec une incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C, pendant 3 jours par comptage des cfu/mL (inoculum : environ 10^5 - 10^6 cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les modifications de la composition du TSB/10 consistent en remplacement de l'extrait de soja par extrait de levure, une concentration variable de peptone de caséine (CP) et remplacement du dextrose par du

lactate 10 mM (concentration finale). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Les résultats montrent que l'optimum de croissance de Rta est obtenu avec une concentration en extrait de levure à 0,2 g/L et de peptone de caséine à 0,5 g/L, soit trois fois moins que la concentration utilisée dans le milieu TSB/10 (1,7 g/L) (Fig. 31).

3.1.5. Température optimale pour la croissance

Dans un bioréacteur, on fixe généralement une température optimale, en acceptant une légère variation autour de cette valeur cible. La température optimale pour la croissance de Rta avait été déterminée comme étant 30 °C (Heulin *et al.*, 2003). Nous avons voulu déterminer si Rta était capable de croître à des températures plus basses, sachant qu'il avait été montré que sa croissance était très faible à 37 °C (Heulin *et al.*, 2003). Nous avons testé trois températures au cours d'une même expérience (20, 25 et 30 °C). Rta a montré une croissance très lente à 20 °C. À 25 et 30°C, sa croissance est identique sur la base des dénombrements et des observations microscopiques (Fig. 32). La température optimale pour la croissance de Rta se situe donc entre 25 et 30 °C.

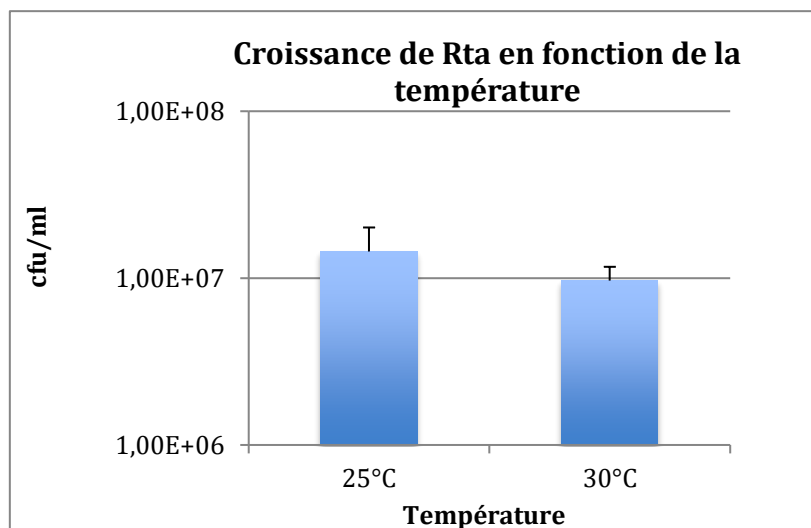


Figure 32 : Comparaison de la croissance de Rta à 25 et 30 °C dans un milieu TSB/10, incubé sous agitation 150 rpm, pendant 3 jours par comptage des cfu/mL (inoculum : environ 10⁵-10⁶ cfu/mL, dilution au 1% d'une préculture en tube à essai). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

3.2. Optimisation du milieu et production de polymère en fed-batch

Dans le paragraphe 3.1., nous avons vu que, même après avoir déterminé la source de carbone optimale pour Rta et mis en évidence sa faible résistance à la force ionique, la croissance de Rta reste faible. De plus, les variations de la concentration de tryptone et d'extrait de levure influencent peu la croissance de Rta. L'ensemble de ces résultats laisse supposer qu'il existe un facteur limitant inconnu, empêchant la croissance bactérienne. Nous supposons que ce n'est pas la composition complexe du milieu de culture qui fournit une large gamme de facteurs de croissance. L'effet osmotique a été décrit dans le paragraphe 1.3.1.3. et nous avons montré qu'il n'était pas l'origine de la limitation de la croissance. La température de 30 °C était déjà décrite comme optimale (Heulin *et al.*, 2003). Donc, afin d'améliorer les conditions de culture, il restait à tester le

changement du pH pendant la croissance et également les besoins en oxygène. La seule façon de suivre ces deux paramètres en continu est une culture fed-batch en bioréacteur.

3.2.1. Besoin en oxygène et optimum de pH

La régulation continue du pH et de la quantité en oxygène dans le milieu de culture est très importante pour la croissance bactérienne. Il est connu que, dans une culture bactérienne en batch, le pH peut diminuer ou augmenter et le taux d'oxygène dissous peut diminuer au cours de la croissance bactérienne. Ces changements sont le résultat des réactions métaboliques utilisant l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons et des réactions produisant des molécules acides ou basiques. Donc, il est essentiel de connaître l'évolution du pH et du taux d'oxygène en continu. Le suivi de ces deux paramètres dans des Erlenmeyers est pratiquement impossible. Le seul moyen de suivre en continu les évolutions du pH et la diminution de l'oxygène dissous est la culture en bioréacteur muni de sondes pH et pO₂.

L'expérience a été effectuée avec une culture de Rta en milieu TSB/10 supplémenté de lactate 10 mM, avec un point de consigne à pH 7,0 et deux injections d'acide lactique (To + 2,5 et + 4 jours). Le taux de dioxygène dissous, fixé à 100 % en début d'expérience, atteint 50 % en fin d'expérience (Fig. 33). Cela ne représente pas une diminution drastique par comparaison avec des bactéries testées dans les mêmes conditions (*Streptococcus*, *Rhizobium*). De plus la concentration en oxygène dissous ne descend pas en dessous du seuil de 20 % qui déclenche une cascade de régulations. Donc l'oxygénation ne semble pas être le facteur limitant. Par contre au cours de la culture dans le bioréacteur, le milieu s'alcalinise très rapidement avec un pH initial de 7,0 atteignant 8,7 en fin d'expérience (+ 7 jours) (Fig. 33). Après chaque injection d'acide lactique (concentration finale : 2,2 mM), le pH baisse brutalement, mais redevient alcalin en moins de 24 h (Fig. 33). Ces deux injections d'acide lactique ne semblent pas avoir d'effet sur la cinétique de croissance de Rta (Fig. 34). L'addition du substrat carboné (TSB: 1 g/L), au quatrième jour de croissance, ne permet pas de modifier la cinétique de croissance, avec un D.O. qui se stabilise à 0,16 (Fig. 34). Dans ces conditions de culture, il reste encore au moins un ou plusieurs facteurs limitant la croissance de Rta.

Changement du pH et pO₂ pendant la croissance de Rta en Fed-batch dans
milieu TSB/10 10mM lactate

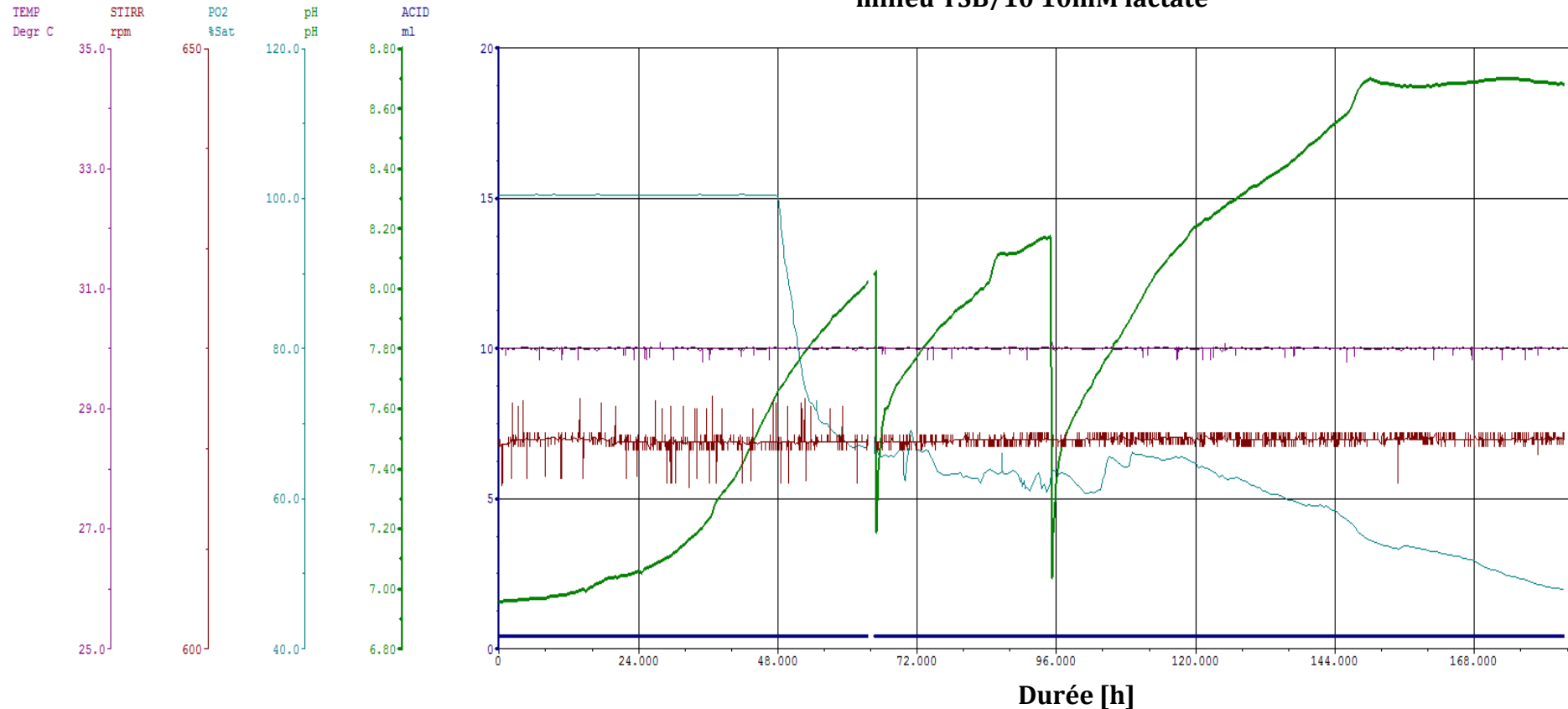


Figure 33 : Première expérience de développement de Rta en milieu de culture TSB/10 supplémenté du lactate 10 mM dans un bioréacteur. Le graphique présente les courbes de pH, pO₂, température et agitation. Deux injections d'acide lactique stérile et concentré (80 %, concentration finale 2,2 mM) ont été faites à To + 65 h et To + 95 h. Les consignes étaient les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, agitation à 1,98 m/s et température de la culture de 30 °C.

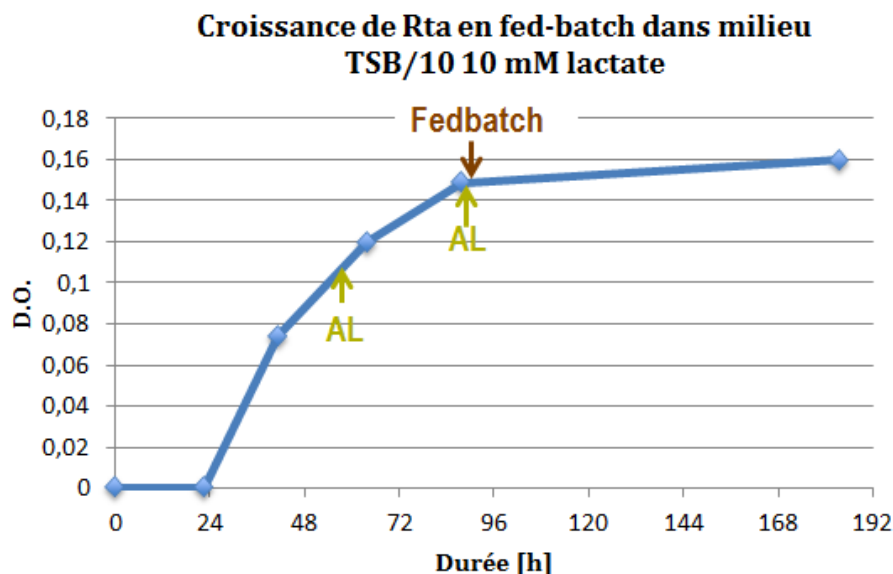


Figure 34 : Croissance de Rta pendant la première expérience en bioréacteur dans milieu TSB/10 supplémenté du lactate 10 mM. Mesure de la D.O. à 600 nm. Les consignes sont les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, agitation à 1,98 m/s, température de la culture à 30 °C. Les deux injections d'acide lactique (AL) 80 % et l'addition du substrat carboné (TSB : 1 g/L) sont indiquées par des flèches.

Nous avons fait l'hypothèse que l'alcalinisation du milieu de culture pouvait être l'un de ces facteurs limitant la croissance de Rta. Pour réguler le pH d'une culture qui a tendance à s'alcaliniser on utilise généralement une solution acide, comme par exemple l'acide sulfurique dilué. Nous avons vu précédemment que, dans le cas de Rta, une telle acidification se traduit par une augmentation de la force ionique du milieu ralentissant sa croissance. Pour pallier ce problème potentiel, nous avons décidé d'utiliser l'acide lactique à la fois comme source de carbone et d'énergie et comme régulateur du pH, en l'apportant en continu dans cette expérience, et non pas en apports ponctuels (cf. expérience précédente).

Nous avons donc réalisé une deuxième culture de Rta en bioréacteur dans un milieu TSB/10 supplémenté de lactate 10 mM, en maintenant les mêmes consignes que dans l'expérience précédente, à l'exception du pH qui a été ajusté avec de l'acide lactique (AL) dilué à 10% et délivré en continu, avec un point de consigne à pH 7,6. Lors de cette deuxième culture en bioréacteur, nous avons confirmé que la concentration en oxygène diminue de moitié pendant la culture (Fig. 35). Il est intéressant de noter que, dans ces conditions et au bout de trois jours, la culture de Rta est très enrichie en agrégats de kystes.

**Croissance de Rta en fed-batch dans milieu TSB/10 10mM lactate, en
ajustant le pH avec de l'acide lactique**

*S par
B310*

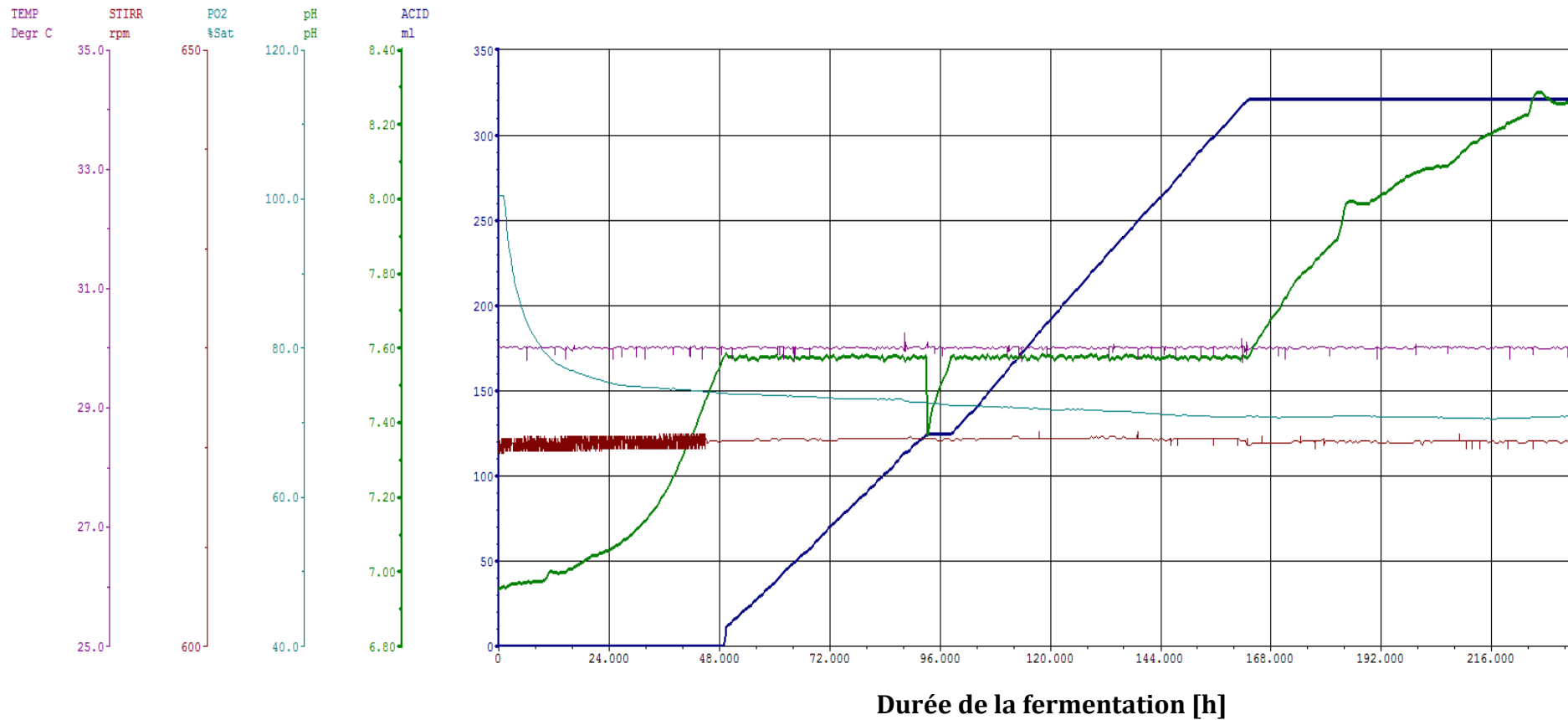


Figure 35 : Évolution du pH, de la pO₂, de la température, de l'agitation et de l'addition d'acide lactique (AL 10%) lors de la deuxième expérience de développement de Rta dans un milieu de culture TSB/10 + de lactate 10 mM dans un bioréacteur. Le pH a été régulé par une injection continue d'acide lactique (AL) 10 %. Un apport de TSB (1 g/L) a été effectué au quatrième jour. Les consignes étaient les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, agitation à 1,98 m/s et température de la culture à 30 °C.

La consommation d'acide lactique a été constante pendant toute la durée de la culture en fed-batch (Fig. 37).

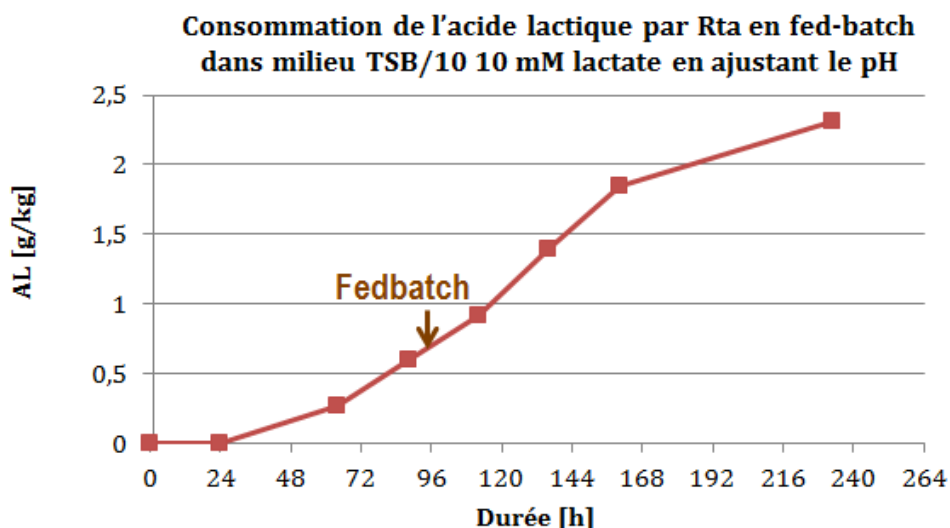


Figure 36 : Consommation de l'acide lactique suivi en HPLC lors de la deuxième expérience de développement de Rta dans un milieu de culture TSB/10 + de lactate 10 mM dans un bioréacteur. L'acide lactique (AL 10 %) a été apporté pour réguler le pH (consigne pH 7,6) et un apport de TSB (1 g/L) a été réalisé au quatrième jour. Les consignes étaient les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, une agitation à 1,98 m/s, et température de la culture à 30 °C.

Nous observons que dans cette expérience, où le pH a été maintenu à une valeur de 7,6 pendant les 7 premiers jours (Fig. 35), l'addition de TSB (1 g/L) au quatrième jour s'est traduite par un redémarrage de la croissance, qui avait atteint un premier plateau (D.O. 0,11), pour atteindre une D.O. de 0,25 (To+7 jours) (Fig. 37). Néanmoins, cette augmentation de la D.O., est liée à une croissance plus importante des bâtonnets et plus faible des kystes.

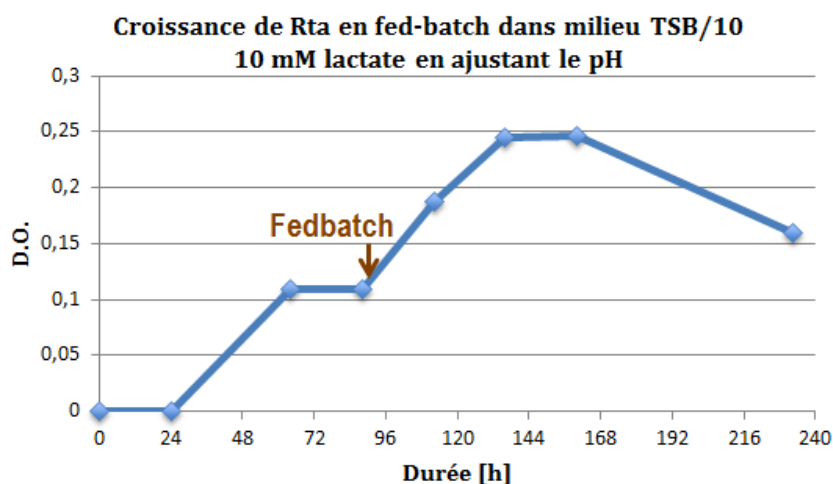


Figure 37 : Croissance de Rta estimée par la mesure de la D.O. à 600 nm lors de la deuxième expérience de développement de Rta dans un milieu de culture TSB/10 + de lactate 10 mM dans un bioréacteur. L'acide lactique (AL 10 %) a été apporté pour réguler le pH (consigne pH 7,6) et un apport de TSB (1 g/L) réalisé au quatrième jour. Les consignes étaient les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, une agitation à 1,98 m/s, et température de la culture à 30 °C.

L'arrêt de l'injection d'acide lactique au-delà du 7ème jour de culture se traduit par une remontée immédiate du pH (8,4) (Fig. 35) et un arrêt de la croissance de Rta, voire même un début de lyse bactérienne (Fig. 37). Cette observation confirme la sensibilité de Rta à un pH trop alcalin.

3.2.2. Croissance bactérienne en fonction de la quantité des composants organiques dans le milieu de culture, en ajustant le pH

Nous avons vu que la croissance de Rta n'est pas stimulée par une augmentation de la concentration en tryptone et en extrait de levure, lorsque le pH n'est pas ajusté en continu (conditions en batch, cf. paragraphe 3.1.4. chapitre 1, Fig. 31). D'autre part, nous avons mis en évidence que le pH était le principal facteur limitant à la fois en batch (cf. paragraphe 3.2.1., chapitre 1) et en fed-batch dans le paragraphe précédent. Nous avons donc voulu tester la réponse de la croissance de Rta à une augmentation de la concentration en substrats et cofacteurs organiques : tryptone, extrait de soja ou extrait de levure, tout en ajustant le pH en continu.

La troisième expérience de croissance de Rta en bioréacteur a été faite dans un milieu de départ un peu moins riche en tryptone et en extrait de levure contenant : tryptone 1 g/L, extrait de levure 0,3 g/L, K_2HPO_4 0,25 g/L, NaCl 0,5 g/L et 10 mM de lactate. Un apport de tryptone 3 g/L et d'extrait de levure 1 g/L a été fait au 5ème jour de croissance. Cette stratégie consistant à démarrer la culture avec un milieu moins riche, puis d'augmenter la concentration en tryptone et en extrait de levure, tout en assurant une régulation continue du pH, s'est révélée fructueuse puisque la valeur de D.O. atteinte (0,6) est bien supérieure à toutes celles que nous avons obtenues jusqu'à cette expérience (Fig. 38), y compris en conditions de fed-batch (D.O. = 0,25) (Fig. 37).

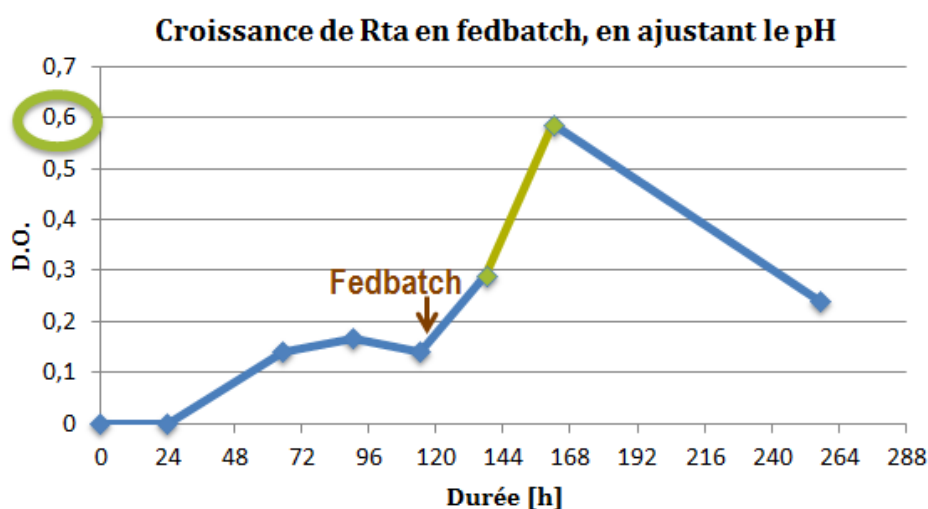


Figure 38 : Croissance de Rta (D.O. à 600 nm) dans un bioréacteur avec un milieu composé de tryptone 1 g/L, extrait de levure 0,3 g/L, K_2HPO_4 0,25 g/L, NaCl 0,5 g/L et 10 mM de lactate. Le pH est régulé en continu par addition d'AL 10 %. Addition à To+5 j de tryptone 3 g/L et extrait de levure 1 g/L. Les consignes étaient les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, une agitation à 1,98 m/s, et température de la culture à 30 °C.

Deux autres cultures en bioréacteur ont été réalisées avec un milieu de culture cette fois-ci plus riche au départ : 4 g/L tryptone, 1,3 g/L extrait de levure, 0,25 g/L K_2HPO_4 ,

0,5 g/L NaCl et 10 mM de lactate. Au troisième jour de croissance, nous avons apporté le complément suivant : tryptone 1 g/L et extrait de levure 0,3 g/L. Le pH est ajusté en continu à environ 7,6. Cette décision d'utiliser au départ un milieu de culture plus riche a permis d'atteindre plus rapidement une D.O. élevée au quatrième jour de croissance (0,58). À ce stade, la culture de Rta est très enrichie en kystes. L'apport du complément à To+4 j s'est traduit par une stimulation de la croissance (D.O. 0,76 à To+6 j) (Fig. 39). Cette augmentation de la D.O. lors de la deuxième phase de croissance s'accompagne d'une augmentation de la proportion de bâtonnets et d'une diminution d'agrégats de kystes, phénomène que nous avons observé également dans l'expérience précédente. L'objectif étant d'optimiser la production de biomasse de kystes, il faut donc privilégier les conditions de culture de cette dernière expérience, en arrêtant la croissance à To + 3/4 j, avant le second apport de substrat nutritif.

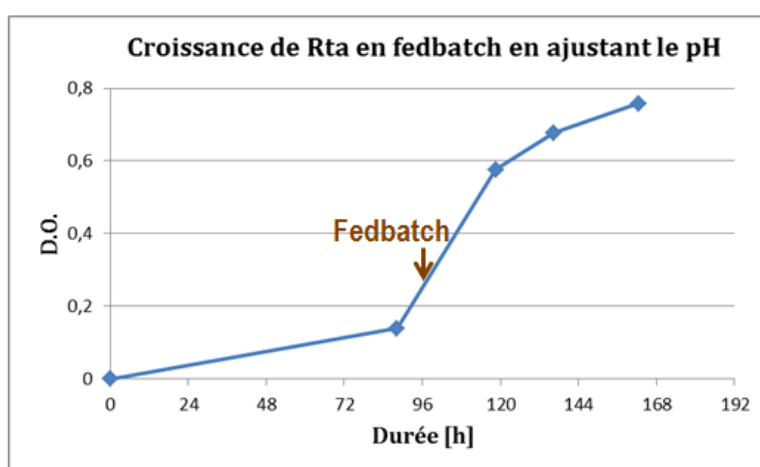


Figure 39 : Croissance de Rta (D.O. à 600 nm) dans un bioréacteur avec un milieu composé de tryptone 4 g/L, extrait de levure 1,3 g/L, K_2HPO_4 0,25 g/L, NaCl 0,5 g/L et 10 mM de lactate. Le pH est régulé en continu par addition d'AL 10 %. Addition à To + 4 j de tryptone 1 g/L et extrait de levure 0,3 g/L. Les consignes étaient les suivantes : apport d'air stérile de 0,2 vvm, une agitation à 1,98 m/s, et température de la culture à 30 °C.

3.2.3. Production du polymère en fed-batch

Le but de cette étude était d'optimiser la production de biomasse de kystes de Rta afin de pouvoir extraire des quantités suffisantes d'EPS, en particulier pour en faire l'analyse (cf. Chapitre 2). Nous avons choisi de faire cette production en bioréacteur de 30 L avec un volume utile de culture de 15 L, lors de trois expériences en fed-batch dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent et en utilisant un milieu de culture optimisé : tryptone 4 g/L, extrait de levure 1,3 g/L, 10 mM de lactate, en ajoutant des macroéléments et une solution de microéléments (cf. Chapitre 1, paragraphe 2.3.2, page 54), avec un contrôle continu du pH 7,6 avec de l'acide lactique (10 %). Au 3^{ème} jour de ces expériences, les cultures sont denses avec beaucoup d'agrégats visibles à l'œil nu. Les observations au microscope confirment la présence d'agrégats de kystes, les cellules non agrégées étant essentiellement des bâtonnets. Nous avons observé une très bonne reproductibilité de la production de biomasse de Rta lors des trois fed-batch, les valeurs de D.O. au troisième jour de culture variant de 0,6 à 0,7. En arrêtant les cultures au

troisième jour, cela nous a permis d'obtenir des cultures homogènes de Rta à partir desquelles nous avons pu extraire des échantillons d'EPS également très homogènes pour leur analyse biochimique.

4. Conclusion

Nous avons également montré que Rta préfère comme source de carbone le lactate et le β -hydroxybutyrate. Nous avons choisi le lactate en raison de sa disponibilité compatible avec un up-scaling de la production. Parallèlement nous avons montré que l'acétate et le succinate ne semblent pas être utilisés efficacement comme source de C et d'énergie en présence de TSB/10. L'addition de carbonate (CaCO_3 , NaHCO_3 , KCO_3) dans le milieu de culture n'a pas permis de stimuler la croissance de Rta, probablement en raison d'une impossibilité de libération de CO_2 par le carbonate dû à un pH trop élevé. Nous avons également mis en évidence que Rta présentait une faible résistance à la pression osmotique, nous obligeant à utiliser l'acide lactique pour réguler en continu le pH qui a tendance à augmenter très rapidement en l'absence de régulation.

L'optimisation des conditions de culture de Rta a permis de révéler certaines particularités de cette bactérie. Ce travail a permis de montrer en particulier que le verrou majeur de la croissance de Rta est l'augmentation du pH qui a besoin d'être régulé en continu avec l'acide lactique, dans nos conditions expérimentales et en fed-batch. Grâce à nos travaux d'optimisation de la croissance de Rta, nous sommes passés d'une faible croissance en batch avec un milieu TSB/10 (**D.O.** < **0,1**, 10^7 - 10^8 cfu/mL) (Fig. 14, page 59), à une croissance plus importante en batch avec un milieu TSB/10 + lactate 10 mM (**D.O.** **0,15**) (Fig. 20). En bioréacteur et en conditions de fed-batch, nous sommes passés d'une D.O. = 0,16 avec milieu TSB/10 + lactate 10 mM, sans régulation de pH (Fig. 34), à une D.O. = 0,25 dans les mêmes conditions et avec une régulation du pH (Fig. 37), et enfin à une **D.O.** = **0,8** (Fig. 39) avec un milieu enrichi au départ de la culture (10 mM de lactate + 4 g/L tryptone, 1,3 g/L extrait de levure, 0,25 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L NaCl) par rapport au TSB/10 + 10 mM de lactate utilisé dans toutes les expériences précédentes.

Cette optimisation des conditions de culture de Rta (composition du milieu, régulation du pH) nous a permis d'obtenir une biomasse de Rta enrichie en kystes permettant d'extraire suffisamment d'EPS pour son analyse biochimique (Chapitre 2).

Chapitre 2 : Extraction, solubilisation et caractérisation de l'EPS de *R. tataouinensis TTB310*

Nous avons décrit les étapes et les résultats de l'optimisation du milieu de culture pour la croissance de *Rta*. Finalement nous avons obtenu des cultures suffisamment denses en kystes et donc en EPS pour réaliser la caractérisation biochimique de l'EPS. Dans ce deuxième chapitre nous décrivons le choix et la conception du protocole d'extraction de l'EPS de *Rta*, prenant en compte le fait que ce polymère est fortement "fixé" à la membrane externe de la bactérie. Par la suite nous présentons les résultats des analyses de la composition et de la structure de l'EPS qui incluent l'analyse élémentaire, le dosage colorimétrique des sucres totaux et des acides uroniques, l'analyse des sucres par CPG, l'analyse des lipides par HPLC et l'analyse de la structure par spectrométrie de masse (FTICR-MS), RMN et FTIR. Nous n'avons pas réussi à caractériser les propriétés rhéologiques de l'EPS, car nous n'avons pas pu le solubiliser. Finalement nous avons pris un recul critique vis-à-vis de ces travaux et nous proposons certaines améliorations du protocole d'extraction, en prouvant leur fiabilité par une analyse élémentaire et en FTIR.

Dans ce Chapitre 2, j'ai participé sur place à la totalité des expériences de CPG effectuées dans l'équipe de Catherine GARNIER (BIA-INRA, Nantes) et j'ai interprété les résultats grâce aux conseils de Sophie LE GALL. Les premières analyses élémentaires ont été sous-traitées au Service "Instrumentation" à l'Institut des Sciences Analytiques du CNRS et j'ai participé à la réalisation des deuxième analyses élémentaires sur la plateforme de la Cité des Énergies (DRT, CEA Cadarache). L'analyse par CPG-méthanolyse a été sous-traitée au Service Commun de Chromatographie du CERMAV à Grenoble (Claire BOISSET-HELBERT). Les analyses de FTICR-MS et de RMN ont été réalisées respectivement par Mourad HARIR et Norbert HERTKORN (Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Dpt of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Allemagne) et interprétées avec l'aide de Catherine SANTAELLA (LEMIRE). Enfin j'ai réalisé et interprété les analyses de FTIR sous la direction de Catherine BERTHOMIEU (LIPM, BIAM, Cadarache).

1. Introduction

Ramlibacter tataouinensis TTB310 est une bactérie isolée d'un sol semi-désertique (Sud tunisien) et donc capable de résister aux conditions extrêmes de ce milieu. Comme plusieurs autres espèces bactériennes colonisant les déserts chauds et secs, *Rta* survit dans un désert grâce à sa capacité de tolérer la dessiccation. Les mécanismes impliqués dans cette tolérance sont probablement multiples et variables selon les espèces. Parmi ces mécanismes sont classiquement évoqués la synthèse intracellulaire de solutés incluant des disaccharides (*e.g.* saccharose et tréhalose), des acides aminés (*e.g.* proline et le glutamate), des amines quaternaires (*e.g.* glycine bêtaïne, carnitine) et des tétrahydropyrimidines (*e.g.* ectoïne, hydroxyectoïne) (Takagi, 2008 ; Potts, 1994 ; Manzanera *et al.*, 2014 ; Sleator et Hill, 2002). Par exemple chez *E. coli* et *Pseudomonas putida* l'accumulation de tréhalose améliore la tolérance à la dessiccation (Castro *et al.*, 2000). Selon certains autres travaux, les bactéries à Gram-positif ont une tolérance plus élevée aux conditions d'anhydrobiose par rapport aux bactéries à Gram-négatif due à leur capacité à accumuler de Mn^{2+} (Potts *et al.*, 2005). Le stress thermique peut également déclencher la synthèse des heat-shock protéines (HSP), en relation ou non

avec une tolérance à la dessiccation (Goyal *et al.*, 2005; França *et al.*, 2007). Certaines bactéries possèdent des mécanismes uniques pour résister la dessiccation. Ainsi les *Deinococcaceae* résiste à l'effet létal des agents endommageant l'ADN en réparant efficacement les lésions à l'ADN causées par la dessiccation ou un rayonnement gamma (Heulin *et al.*, 2012). Un autre mécanisme original permettant à la cyanobactérie filamenteuse *Oscillatoria* de lutter contre la sécheresse est sa capacité à migrer en milieu sec pour rechercher l'eau (hydrotaxie) (Garcia-Pichel et Pringault, 2001).

Il n'est pas exclu que plusieurs mécanismes de tolérance à la dessiccation soient présents chez Rta, y compris la synthèse de tréhalose dont tous les gènes de synthèse et de catabolisme ont été mis en évidence (De Luca *et al.*, 2011). Cependant nous pensons que la tolérance à la dessiccation de Rta est principalement associée à la production de kystes, comme c'est le cas chez les espèces appartenant aux genres *Azotobacter* et *Azospirillum*. Outre la production de kystes, celle de spores bactériennes comme les endospores par les Firmicutes, les exospores par les Actinobacteria, et les akinètes chez les Cyanobacteria sont des mécanismes de tolérance à la dessiccation répandus et bien décrits (Heulin *et al.*, 2012). Les kystes de Rta sont tolérants à la dessiccation et sont morphologiquement proches des kystes d'*Azotobacter* car entourés d'un EPS et contenant des granules lipidiques de polyhydroxyalkanoate dans leur cytoplasme (Heulin *et al.*, 2003). **Contrairement aux kystes décrits à ce jour, les kystes de Rta ne sont pas des cellules dormantes, puisque ces sont des cellules capables de se diviser**, et constituent donc un nouveau mécanisme de tolérance à la dessiccation. Il apparaît donc que la tolérance de Rta à la dessiccation est très probablement liée à la structure de l'EPS qu'elle produit. Il est probable que cet EPS à l'état hydraté (eau disponible à l'extérieur de la cellule) permette le transfert de l'eau et des molécules nécessaires à la division cellulaire, du milieu extérieur au cytoplasme de la cellule bactérienne, et qu'à l'état déshydraté (absence d'eau dans le milieu extérieur) il devient imperméable, empêchant la "sortie" d'eau de la cellule. Cet EPS, produit par un nouveau genre bactérien (*Ramlibacter*), constitutif d'un kyste et synthétisé lors de la division cellulaire, est potentiellement un agent de rétention d'eau original pouvant avoir un réel intérêt sur le plan fondamental et industriel. Pour étayer cette hypothèse, nous avons extrait l'EPS de Rta, déterminé sa structure et effectué des expériences préliminaires pour de futures analyses rhéologiques.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Extraction de l'EPS à l'échelle préindustrielle

Parmi tous les protocoles d'extraction d'un EPS décrits dans la littérature (cf. paragraphe 6.2., synthèse bibliographique), nous avons choisi pour l'EPS de Rta un traitement acide et plus particulièrement à l'acide trichloroacétique (TCA). Ce choix a été dicté par le fait que les essais préliminaires, utilisant des agents complexant les ions comme l'EDTA, n'avaient pas permis d'extraire l'EPS de façon efficace. Nous reviendrons sur la justification plus détaillée du choix de protocole d'extraction dans la partie "Résultats".

Premier protocole d'extraction

La culture de Rta en volume V a été centrifugée pendant 15 min à 6000 g et à

température ambiante. Le culot bactérien a été remis en suspension dans $\frac{1}{2}V$ de tampon PBS modifié selon la particularité de faible résistance à la force ionique de Rta :

PBS modifié	[g/L]
KCl	5
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24
Eau ultrapure	qsp 1 L

Ensuite l'acide trichloroacétique (TCA) a été ajouté à la concentration finale de 4 % et le mélange a été laissé sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté pendant une nuit à température ambiante. Le mélange a été ensuite centrifugé pendant 15 min à 6000 g et à température ambiante. Le surnageant a été récupéré et filtré par filtre seringue (Minisart high flow Sartorius) au seuil de coupure de 0,45 μ m. Dans le filtrat a été rajouté de l'éthanol refroidi à 4 °C en volume V et ce mélange a été laissé à 4 °C pendant une nuit, puis centrifugé pendant 20 min à 6000 x g et à 4 °C. Le culot formé contenait l'EPS.

Protocole d'extraction à l'échelle préindustrielle

Le protocole d'extraction précédent a été optimisé pour faire des extractions d'EPS à l'échelle préindustrielle. Ainsi les volumes de tampon PBS modifié, de TCA (99%, Fisher) et d'éthanol ont été diminués d'un facteur 10. Une autre modification a consisté à introduire une étape de préfiltration avant la filtration sur une membrane au seuil de coupure de 0,45 μ m (Type HA Millipore). Cette préfiltration se déroule en utilisant un filtre plaque en cellulose (3M 080HT A 4003, Zeta plus) d'environ 0,45 μ m. Nous avons également essayé de précipiter l'EPS en rajoutant l'un des sels suivants : NaCl, KCl, MgCl₂ ou CaCl₂ en concentration finale 40 g/L juste après l'étape de filtration et avant l'ajout d'éthanol.

Protocole d'extraction modifié

La culture de Rta réalisée en Erlens à baffles de 2 L contenant 500 mL (volume V) du milieu de culture optimisé (milieu de bioréacteurs de 30 L, Chapitre 2, cf. paragraphe 2.3.2) et incubée sous agitation 150 rpm, à 30 °C a été centrifugée au 4^{ème} jour de croissance pendant 15 min à 6000 g et température ambiante. Le culot bactérien a été résuspendu dans un vingtième du volume V de tampon PBS modifié supplémenté avec 4 % d'acide trichloroacétique (TCA). Cette solution a été laissée sous agitation à l'aide d'un barreau aimanté pendant une nuit à température ambiante. Par la suite la solution a été centrifugée pendant 15 min à 6000 g et à température ambiante. Le surnageant a été récupéré et filtré sur un filtre seringue (Minisart high flow Sartorius au seuil de coupure de 0,45 μ m). Le filtrat a été neutralisé jusqu'à pH 7,0 avec KOH 1 M. Dans le filtrat neutralisé a été rajouté de l'éthanol refroidi à 4 °C en un dixième du volume V et ce mélange a été laissé à 4 °C pendant une nuit. Un précipité blanc de polymère a été alors observé et cette solution a été centrifugée pendant 20 min à 6000 g et à 4 °C. Le polymère récupéré dans le culot a été remis en suspension, puis laissé reposer 10 min à 4 °C, et enfin centrifugé successivement avec des concentrations en éthanol en gradient 70 %, 80 %, 90 % et 100 %. Le polymère obtenu a été dialysé à MWCO 1 kDa (boudin de dialyse Spectra/Por 7).

Essais de solubilisation de l'EPS par sonication

Les échantillons d'EPS ont été utilisés à la concentration finale de 0,1 % soit dans solution de NaCl 0,1 M ou de NaCl 1 M, soit dans d'eau UP. Le pH a été ajusté soit à 7,0 soit à 10,7. Le pH des échantillons extraits selon le protocole modifié n'a pas eu besoin d'ajustement parce que sa valeur était proche de la neutralité. Tous les échantillons ont été agités à 40 °C. Puis la température est augmentée à 60 °C au bout de 30 min ou 24 h, le pH est ajusté si besoin. Plusieurs sonications ont été effectuées soit dans un bain à ultrasons à 40 °C ou à 60 °C pendant 30 s ou 15 min, soit avec une sonde à ultrasons pendant 2 min. La température est augmentée entre les sonications de 60 °C à 90 °C.

La concentration finale de l'EPS a été ajustée à une concentration de 0,1 % dans du DMSO, puis cette solution agitée et chauffée à 60 °C. Sa concentration finale a été ajustée à 4%.

2.2. Analyse de la composition de l'EPS

2.2.1. Analyse élémentaire

2.2.1.1. Dosage de C, H, N et O

Les analyses élémentaires pour le dosage de C, H, N et O ont été réalisées par le Service instrumentation dans l'Institut des Sciences Analytiques (ISA-CNRS). La détermination de la quantité de carbone et d'hydrogène a été faite par une combustion totale du prélèvement analytique à 1050 °C sous courant d'oxygène. Le carbone et l'hydrogène des échantillons sont respectivement transformés en dioxyde de carbone et en eau et quantifiés par des détecteurs spécifiques infrarouges CO₂ et H₂O. La détermination de la quantité d'azote a été réalisée par la méthode de DUMAS qui consiste en une combustion totale du prélèvement analytique à 1050 °C sous courant d'hélium et d'oxygène. L'azote des échantillons a été transformé en divers oxydes d'azote réduits en azote moléculaire. Le dioxyde de carbone et l'eau issus de la combustion ont été piégés sur de l'ascarite et du perchlorate de magnésium. L'azote a été quantifié par un détecteur à conductibilité thermique. La détermination de l'oxygène a été réalisée par une pyrolyse totale du prélèvement analytique à 1080 °C sous courant d'azote. L'oxygène des composés de pyrolyse obtenus a été transformé en monoxyde de carbone par passage sur du charbon actif à 1120 °C. Le monoxyde de carbone a été quantifié par un détecteur spécifique infrarouge CO. Cette méthode s'applique aux composés organiques.

L'analyse élémentaire pour le dosage de C, N et O dans l'EPS extrait selon le protocole modifié a été effectuée avec un analyseur d'éléments organiques (Thermo Scientific FLASH™ 2000 CHNS/O, Thermo Fisher Scientific, USA) dans l'équipe de Jean-François SASSI (DRT, CEA Cadarache). La détermination de la quantité de carbone, d'hydrogène et d'azote a été réalisée par une pyrolyse totale du prélèvement analytique à 1800 °C en présence d'oxygène. Le carbone, l'hydrogène et l'azote des échantillons ont été respectivement transformés en CO₂, H₂O et NO_x. Les NO_x ont été ensuite réduits en N₂. Une colonne de chromatographie gazeuse sépare ces gaz qui ont été ensuite détectés par un catharomètre.

2.2.1.2. Dosage du chlore

Le chlore présent dans les échantillons d'EPS a été quantifié par la minéralisation de micro-prélèvements analytiques. Ceci a été atteint par une combustion totale dans l'oxygène (O₂), catalysée par une grille de platine en fiole de Shöniger. Le chlore contenu dans les gaz de combustion a été ensuite absorbé et quantitativement réduit en ion chlorure par la solution de peroxyde d'hydrogène (110 vol.). Les solutions obtenues après minéralisation ont été ensuite analysées par chromatographie ionique à haute pression (HPIC, Waters) avec une de séparation (IC-Pak Anion HC Column, 4.6 x 150 mm, Waters) remplie d'une résine polyméthacrylate avec des sites échangeurs de type ammonium quaternaire. L'éluant était du Na₂CO₃ 1,5 mmol/L et du Na₂HCO₃ 1,5 mmol/L avec un débit de 2 mL/min et une pression de 1100 Psi. L'intégration des pics a été faite par le logiciel MILLENIUM 3.2.

2.2.2. Dosages colorimétriques

2.2.2.1. Monosaccharides totaux

La quantité de monosaccharides totaux a été mesurée par le test de Dubois *et al.* (1956). Une solution de glucose en concentration 1 mg/mL a été préparée. Des solutions ont été faites pour obtenir des concentrations finales de 0,1 ; 0,08 ; 0,06 ; 0,04 et 0,02 mg/mL. Ces dilutions et un blanc ont été utilisés pour la gamme étalon (1 mL). De 1 à 2,5 mg/mL d'échantillon ont été utilisés pour les mesures colorimétriques. Les échantillons ont été resuspendus dans H₂SO₄ 1 M, dans un bain-marie à 90 °C pendant 1 h. Après l'hydrolyse, les échantillons ont été dilués 10 et 20 fois (1 mL). Ces dilutions ont été utilisées pour les analyses.

Dans les standards et les échantillons a été ajouté 1 mL de phénol 5 %. Immédiatement après l'ajout de phénol, ont été ajoutés 5 mL H₂SO₄ concentré (96-98 %), avec traitement thermique à 90 °C dans un bain-marie pendant 5 min. Les échantillons ont été refroidis dans la glace pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 490 nm.

2.2.2.2. Acides uroniques

Les conditions d'hydrolyse pour la quantification des acides uroniques ont été les mêmes que celles pour l'analyse en CPG (cf. paragraphe 2.2.4, chapitre 2). Les acides uroniques ont été quantifiés en utilisant la méthode colorimétrique de métahydroxydiphényl (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973).

2.2.3. Analyse HPLC de la composition et la quantité des lipides

2.2.3.1. Détection des lipides neutres

Les lipides extraits ont été dissous dans du chloroforme avant d'être injectés dans une colonne HPLC. La chromatographie en phase normale a été effectuée en commençant par une phase chloroforme puis un mélange "chloroforme/méthanol : 30%/ammoniaque dans l'eau" avec le ratio volumique : 1/92/7 (v/v/v). La colonne était connectée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière pour quantifier les molécules éluées. L'identification des classes de lipides a été effectuée par comparaison des pics de rétention avec ceux des standards purs composés par un mélange d'acide oléique et ses mono-, di- et triacylglycérols. Les courbes de calibration pour chaque

classe ont été obtenues en traçant la surface du pic par rapport la quantité injectée des solutions "standard" diluées en série (0,5-4 µg). Un ajustement quadratique donne le meilleur facteur de corrélation et permet de calculer le pourcentage de masse des classes de lipides dans les échantillons analysés.

2.2.3.2. Fractionnement des lipides

Les analyses HPLC ont été réalisées avec un système HPLC modulaire (UltiMate 3000 RS, Dionex, France) couplé avec un détecteur de dispersion de lumière par évaporation Sedex 85 (Sedere S.A., Alfortville, France). Le logiciel "Chromeleon Chromatography Management Software" (Dionex) a été utilisé pour le contrôle du système et traitement des données. Le système HPLC Dionex RSLC Ultimate 3000 (Voisins Le Bretonneux, France) était équipé de deux pompes, un système de gradient, un dégazeur et un injecteur automatique avec une capacité d'injection 100 µL. La colonne analytique contenait une phase normale de silice (Prevail Silica 3 mm Grace: 150 mm 4.6 mm I.D., Alltech Associates Inc., Lokeren, Belgium). La séparation chromatographique a été réalisée en utilisant un gradient linéaire en plusieurs étapes binaires, selon le schéma suivant : t₀ min: 0 % B, t₈ min: 50 % B, t₁₂: 100 % B, et finalement des conditions isocratiques (100 % B) pendant 3 min. La phase mobile a été ramenée aux conditions initiales et la colonne a été laissée à l'équilibre jusqu'à l'injection suivante. Le temps total d'exécution du chromatogramme a été de 20 min par échantillon. L'éluant A était du chloroforme et l'éluant B était composé de CH₃OH/CHCl₃/ NH₃OH (460/5/35; v/v/v). Le débit a été fixé à 1,5 mL/min. Les classes de lipides ont été détectées et quantifiées par un détecteur de dispersion de lumière par évaporation (ELSD, SEDEX Model 85 LT-ELSD™, Sedere, Alfortville, France). La pression du gaz nébuliseur (air) a été maintenue à 3,5 bars et la température de tube de chauffage a été fixée à 50 °C. L'identification des classes de lipides a été effectuée par une comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards purs. Les courbes de calibration pour les triglycérides (TAG), les diglycérides (DAG), les monoglycérides (MAG) (Supelco) et les acides gras libres (FFA) (Sigma) ont été obtenues par traçage de la surface du pic par rapport à la quantité injectée de dilutions standards (0,5-4,0 µg). Un ajustement quadratique donne le meilleur facteur de corrélation et permet de calculer le pourcentage de masse des classes de lipides dans les échantillons analysés.

2.2.4. Analyse CPG de la composition et la quantité en monosaccharides

Deux analyses différentes en CPG ont été réalisées.

La première identification et la quantification de monosaccharides neutres ont été réalisées par CPG après une hydrolyse dans l'acide sulfurique (Hoebler *et al.*, 1989). Un échantillon de 5 mg d'EPS lyophilisé a été hydrolysé dans l'acide sulfurique 13 M et laissé à 30 °C pendant 30 min. Ce mélange a été dilué jusqu'à une concentration d'acide sulfurique 1 M et l'hydrolyse prolongée en chauffant à 100 °C pendant 2 h. Les monosaccharides sont alors transformés en acétates d'alditols selon Blakeney *et al.* (1983) et chromatographiés dans une colonne TG-225 GC (30 x 0.32 mm ID) en utilisant le modèle TRACE™ Ultra Gas Chromatograph (Thermo Scientific™); température 205 °C et gaz vecteur H₂. Des monosaccharides de référence et de l'inositol comme standard interne ont été utilisés pour la calibration.

La deuxième analyse par CPG a été effectuée après une méthanolyse. Pour ce faire

entre 1,8 et 3,2 mg de l'échantillon d'EPS et 50 µg de *myo*-inositol (référence interne) ont été placés dans un bain à sec en présence de 500 µL d'un mélange méthanol/acide chlorhydrique 3 N ou 2N (Supelco) pendant 4 h à 110 °C. Après refroidissement à température ambiante, le méthanolysat a été neutralisé à l'aide de carbonate d'argent, et les échantillons ont été centrifugés à 3000 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été évaporé sous jet d'azote. Les composés ont été ensuite dissous dans 100 µL de pyridine et incubés pendant une nuit à température ambiante avec 100 µL de sylon (BSTFA : TMCS. 99:1. Supelco). Après évaporation douce des réactifs en excès sous jet d'azote, les méthylglycosides triméthylsilylés ont été repris dans 700 µL de dichlorométhane, puis injectés en chromatographie en phase gazeuse (Système GC-6850 AGILENT, injection *in*-colonne, détecteur FID : ionisation de flamme). Le gaz vecteur est l'hydrogène. La colonne de type HP-5MS est apolaire (longueur : 30 m et diamètre interne : 0,25 mm). Le programme de montée en température a été le suivant : 120 °C maintenu pendant 1 min, puis un gradient de 1,5 °C/min jusqu'à 180 °C, suivi d'un gradient de 2 °C/min jusqu'à 200 °C. Chaque monosaccharide a été identifié par comparaison avec les temps de rétention des étalons internes traités dans les mêmes conditions. Un coefficient de réponse a été calculé pour chaque monosaccharide par rapport à l'étalon interne afin de définir leur proportion au sein du polysaccharide.

2.2.5. Recherche de traces d'ARN

La détection d'ARN dans les échantillons d'EPS pour tester l'hypothèse de l'origine ribosomique du ribose a été effectuée à l'aide du spectrophotomètre Nanovue (GE Healthcare). La présence d'ARN a été également vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,1 % dans du TBE 0,5X (Tris, acide borique, EDTA), contenant 0,01 % de BET (p/V). Les dépôts de solutions d'EPS et d'ARN ribosomique standard ont été mis en suspension dans 3 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,02 %-xylène cyanol, 0,02 % - glycérol 3 %-TBE). Après migration sous une tension de 100 V pendant 15 min, les bandes ont été visualisées à l'aide d'un imageur de gels d'électrophorèse (U : Genuis, Syngene).

Les quantifications d'ARN avec le kit « Quant-it™ RiboGreen® » (Invitrogen) ont été réalisées en suivant les recommandations du fabricant.

2.2.6. Spectrométrie de masse

- **Préparation des échantillons**

Les échantillons ont été dilués dans 2 mL H₂SO₄ 5 % (Merck, Allemagne) et soniqués pendant 3 min à température ambiante. Ensuite les échantillons ont été pré-traités par une cartouche SPE C-18 pour les mesures de FT-ICR-MS.

- **Analyses FTICR-MS**

Les masses spectrales de FT-ICR-MS ont été acquises en utilisant un spectromètre de masse (modèle 12 T Bruker Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne) équipé avec une source d'ionisation électrospray en mode négatif. Les échantillons dilués dans du méthanol ont été injectés dans la source électrospray en utilisant une pompe avec un débit de 120 µL/h, une pression de gaz nébuliseur de 138 kPa et une pression de gaz séchant de 103 kPa. Un chauffage à 200 °C a été maintenu pour assurer une désolvatation rapide dans les gouttelettes ionisées. Le spectre a été acquis dans le

domaine temporel de 4 MW, 500 scans étant accumulés pour chaque spectre de masse. Le calcul des formules élémentaires pour chaque pic a été fait en mode batch par un logiciel créé au sein de laboratoire de Mourad HARIR (Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Allemagne). Les formules générées sont validées par réglage des contraintes chimiques sensibles [$O/C \text{ ratio} \leq 1$, $H/C \text{ ratio} \leq 2n+2$ (C_nH_{2n+2}), évaluation d'éléments : $C \leq 100$, $H \leq 200$, $O \leq 80$, $N = 0$, $S = 0$ et un décalage dans la précision de masse qui était fixé à 500 ppb. Les formules finales ont été générées et classées en groupes contenant uniquement des compositions moléculaires de CHO qui ont été utilisées pour visualiser les données des spectres de masse. Cette analyse en FTICR-MS a été réalisée par Mourad HARIR (Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Allemagne).

2.2.7. Analyse par RMN

L'échantillon d'EPS a été soumis à une spectroscopie RMN à l'état de solution. Environ 4 mg d'échantillon sec repris dans 750 μL de D_2O (99,95 % 2H) ont été soumis à un bain ultrasonique, avec réchauffement externe à $\sim 45^\circ\text{C}$. Après centrifugation, le surnageant a été soumis à une spectroscopie RMN de 800 MHz ^1H à 310 K. Après 5 h de traitement, l'échantillon a été centrifugé et le surnageant a été mis dans un tube MATCH de 3,0 mm et scellé. Cette analyse en FTICR-MS a été réalisée par Norbert HERTKORN (Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Allemagne).

2.2.8. Analyse en spectroscopie FTIR

Les spectres en infrarouge ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Bruker IFS 66 piloté par ordinateur pour une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4 000 cm^{-1} . Les échantillons d'EPS lyophilisés sont directement déposés pour la mesure. Les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} . Cette analyse en FTIR a été pilotée par Catherine BERTHOMIEU (LIPM, UMR 7265 BVME, Cadarache).

3. Résultats

Dans ce paragraphe, nous présentons les résultats de travaux d'extraction d'EPS de Rta, les essais de solubilisation de l'EPS, ainsi que les résultats des analyses de la composition et de la structure de l'EPS.

Les EPS bactériens commercialisés comme la cellulose, le curdlan et le xanthane sont sécrétés dans le milieu de culture et produits en grande quantité. Les protocoles mis en place pour leur extraction sont simples et consistent en l'élimination des cellules bactériennes suivies par la récupération d'EPS à partir du milieu de culture. La grande quantité d'EPS sécrétée dans le milieu le rend très dense et visqueux. Le cas de l'EPS produit par Rta est différent. La quantité d'EPS produite par Rta n'est pas comparable avec les exemples donnés ci-dessus. En effet son EPS, même s'il est sécrété, reste fortement attaché à la surface de la cellule. De ce fait, son extraction a nécessité une adaptation du protocole pour permettre la séparation de l'EPS de la membrane externe bactérienne.

3.1. Mise au point de l'extraction

Les EPS bactériens sécrétés sont plus ou moins fortement fixés à la membrane externe des bactéries qui les produisent. Généralement il est plus difficile d'extraire les EPS fermement attachés à la surface cellulaire parce qu'ils exigent une étape supplémentaire dans le protocole. Cette étape consiste à décoller l'EPS de la surface cellulaire à l'aide de différents agents chimiques. C'est le cas de *Rta* car l'EPS est fortement fixé aux kystes qui le produisent. Cette structure est facilement visible sur les photos de microscopie électronique à transmission publiées par Benzerara *et al.* (2004) (Fig. 40). Avec cette technique de microscopie électronique à transmission, l'EPS apparaît sous forme d'un bord dense aux électrons à la surface bactérienne (Porsch *et al.*, 2012) (Fig. 40). Chez *Rta*, ce halo semble très dense, compact, fermement attaché à la surface de la bactérie, ce qui présage des difficultés pour l'extraction.

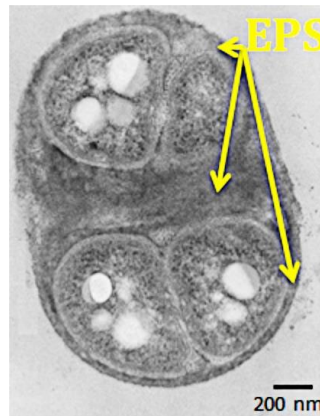


Figure 40 : Kystes de *Rta* en division, observés en microscopie électronique à transmission d'un échantillon en multicouches coupé par ultra microtome de colonie de *Rta* cultivé sur TSA/10 supplémenté avec CaCl_2 . La zone dense aux électrons à l'extérieur des cellules et plus particulièrement dans la zone entre les deux groupes de deux cellules en cours de division correspond à l'EPS.

Des essais d'extraction de l'EPS de *Rta* avaient été réalisés préalablement au laboratoire LEMiRE avant que j'entame mes travaux de thèse. Selon le protocole utilisé au laboratoire, le décollement de l'EPS avait été tenté avec le NaCl et l'EDTA. Puis l'EPS, probablement décollé, avait été précipité avec de l'isopropanol ou de l'éthanol. Ces essais ne semblent pas avoir permis d'extraire des quantités suffisantes d'EPS. Il semble donc que les méthodes qui utilisent seulement des agents complexant des cations ne sont pas suffisantes. Donc, nous avons opté pour une séparation de l'EPS avec des agents chimiques plus efficaces.

Notre choix s'est porté sur l'acide trichloroacétique (TCA) pour décoller l'EPS. L'extraction d'un EPS avec le TCA repose sur un autre principe. Au lieu de complexer les ions, le TCA permet de dénaturer et précipiter les protéines. Il permet de rompre les liaisons glycoprotéiques entre l'EPS et la membrane externe, ainsi libérant l'EPS.

Le protocole utilisé pour l'extraction de l'EPS de *Rta* est inspiré des travaux de Säwen *et al.* (2010), d'Ozturk et Aslim (2010) et de Gorska *et al.* (2011), mais adapté en fonction des besoins et des particularités de *Rta*. Le début du protocole est différent par rapport à l'extraction d'EPS sécrétés se détachant facilement de la cellule et qui consiste à éliminer les cellules bactérienne par centrifugation et à extraire l'EPS à partir du

surageant. Ce protocole commence par la récolte des cellules bactériennes à partir d'une culture en batch ou en fed-batch. Nous avons voulu faire cette extraction en endommageant le moins possible les cellules de Rta pour ne pas contaminer le produit final. Pour éviter de lyser les cellules à cause d'une pression osmotique inadaptée, l'étape suivante consiste en leur remise en suspension dans un tampon. Nous avons choisi d'utiliser le tampon phosphate en le modifiant légèrement pour l'adapter aux spécificités de Rta. Ainsi le tampon PBS avait la composition suivante :

	[g/L]
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,42
KH ₂ PO ₄	0,24
Eau ultrapure	qsp 1 L

Il a été modifié en éliminant le NaCl (8 g/L) et en augmentant la concentration du KCl à 5 g/L. C'est une modification, en accord avec la faible résistance à la force ionique de la bactérie, sans complètement éliminer les sels qui peuvent interagir avec l'EPS et faciliter son extraction. À la suite dans cette mise en suspension, le TCA (concentration finale 4%) a été ajouté afin de décoller l'EPS de la bactérie. En l'absence de TCA, il faut noter que le culot de kystes obtenu après la centrifugation d'une culture de Rta est très agrégé et difficile à remettre en suspension, y compris après forte agitation (vortex). Cela peut être dû à la présence de protéines à la surface des kystes qui contribuent à l'agrégation de ces derniers. La solution finale des cellules dans le tampon PBS supplémenté de 4 % TCA est agitée doucement pendant une nuit, à température ambiante à l'aide d'un barreau aimanté, afin de décoller les kystes entre eux et en même temps de libérer l'EPS. À la fin de cette incubation, une coloration au Calcofluor white permet de visualiser que l'EPS est décollé de la surface des kystes par le fait que le halo fluorescent autour des kystes n'est plus présent. Dans cette suspension, seuls des résidus filamenteux fluorescents sont observés pouvant être considérés comme l'EPS séparés des kystes (Fig. 41).

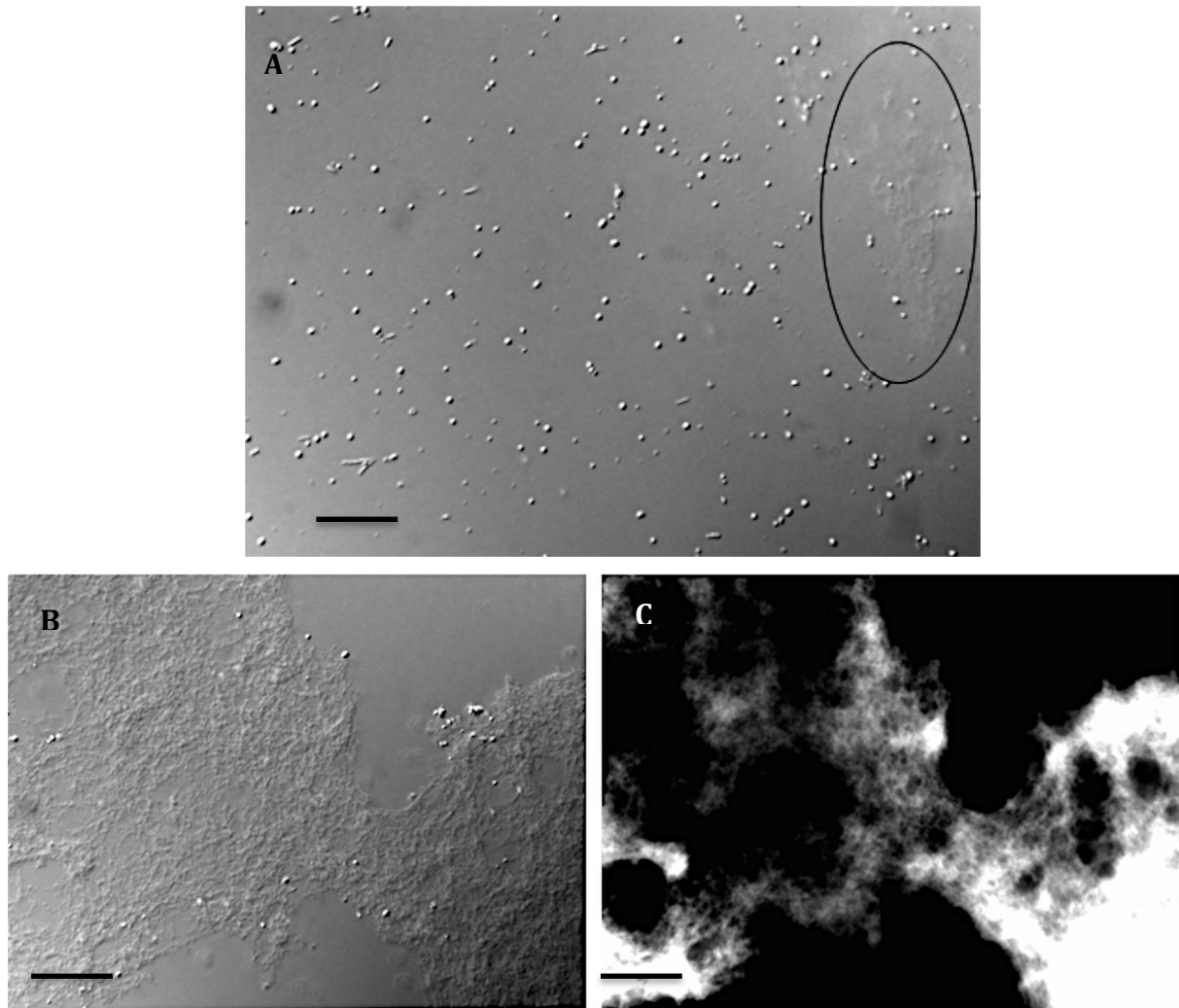


Figure 41 : Décollement de l'EPS de la surface des cellules de Rta après leur suspension dans PBS modifié et traitement au TCA 4%. **A)** Image en microscopie optique où la coloration au Calcofluor white révèle une partie filamenteuse fluorescente (zone détournée). **B)** Image en microscopie optique d'un gros fragment d'EPS décollé. **C)** L'image en fluorescence après coloration au Calcofluor white correspondant à l'image B qui montre la fluorescence du polymère décollé. Barre d'échelle : 20 μm .

Après la séparation de l'EPS des kystes, la solution bactérienne est centrifugée pour éliminer les cellules de Rta. L'EPS reste dans le surnageant et, pour améliorer sa pureté, ce surnageant est filtré au seuil de coupure de 0,45 μm . Nous avons choisi un filtre résistant au TCA 25 % constitué de polyéthersulfone (Minisart high flow Sartorius). À ce stade, il est possible de faciliter l'extraction de l'EPS par l'ajout des sels, puis d'utiliser de l'éthanol pour sa précipitation complète. Ainsi, nous avons testé la précipitation de l'EPS avec quatre sels différents, NaCl, KCl, MgCl_2 et CaCl_2 à une concentration finale de 40 g/L. Cette étape est importante, surtout dans le cas où l'EPS expose des charges négatives qui seront neutralisées par les charges positives des sels dissociés permettant ainsi un changement de conformation de l'EPS et sa précipitation. Parmi les sels testés, seul le KCl a permis d'observer quelques précipités blanchâtres après l'ajout d'éthanol et une décantation pendant une nuit. Ces résultats ne sont pas suffisamment satisfaisants pour ajouter une étape de précipitation supplémentaire dans le protocole final. Ainsi

après la filtration de l'EPS, l'éthanol absolu froid a été ajouté directement et la solution a été laissée à 4 °C pendant une nuit. Après centrifugation, l'EPS sous forme de gel transparent sédimente facilement en formant un culot. Après coloration du gel au Calcofluor white, nous observons une forte fluorescence confirmant que nous avons bien extrait l'EPS de Rta. Nous pouvons en conclure que l'utilisation du TCA a permis de décoller et d'extraire l'EPS de Rta.

La dernière mise au point pour optimiser le protocole pour une application semi-industrielle consiste en une diminution importante de la quantité de tampon PBS, du TCA et de l'éthanol. Le verrou le plus important est lié à l'utilisation d'une quantité importante d'éthanol rendant le processus difficile à exécuter à une échelle pré-industrielle. Le problème provient du fait que l'éthanol est facilement inflammable dans une centrifugeuse. Ainsi il faut utiliser un appareil spécialement adapté (ATEX), afin d'éviter tout incident. De plus l'utilisation de quantités importantes de tampon et de solvant rend le processus trop coûteux. Enfin, selon les expériences que nous avons réalisées, nous n'avons pas observé de diminution drastique du rendement d'extraction de l'EPS en diminuant la quantité de tampon et de solvant.

Nous proposons donc un protocole basé sur ces résultats pour l'extraction de l'EPS de Rta à partir des cultures obtenues en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. Chapitre 1, paragraphe 3.2.3., page 85). Ce protocole est schématiquement représenté dans la Fig. 42. L'EPS extrait selon ce protocole est lyophilisé et utilisé pour des analyses biochimiques.

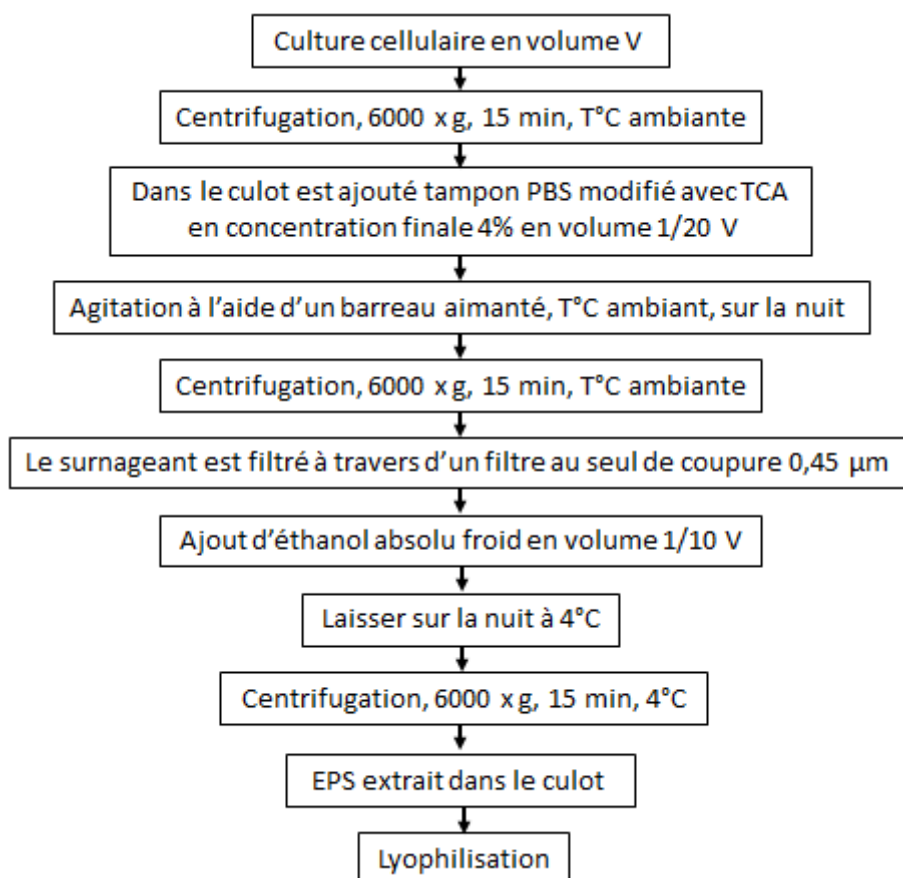


Figure 42 : Protocole d'extraction de l'EPS de Rta utilisé pour les cultures obtenues en bioréacteurs 30 L dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1).

3.2. Solubilisation de l'EPS

D'un point de vue industriel, la production d'un EPS est rentable si ce dernier possède des propriétés rhéologiques intéressantes, permettant sa commercialisation. Ainsi la structure d'un polymère est un point très important, mais ses propriétés rhéologiques sont essentielles. Généralement la solubilisation d'un polysaccharide en phase aqueuse est la première étape pour la réalisation des analyses rhéologiques. Nous présentons ici des résultats sur la solubilité de l'EPS extrait.

La première observation est que l'EPS lyophilisé repris dans de l'eau ultra-pure ou dans une solution de NaCl 0,1 M ajustée à une concentration finale de 0,1 % fait chuter le pH à environ 3,8. Ce pH est tout d'abord neutralisé avec NaOH. Quels que soient les traitements appliqués, *i.e.* agitation en continu en augmentant progressivement la température de 40 à 90 °C, avec une sonication par pulses, un suivi et un ajustement du pH, l'EPS de Rta reste insoluble. Pour tester si cette insolubilité n'était pas due simplement à la congélation ou à la lyophilisation, qui peut avoir des effets sur la conformation des EPS, la solubilisation d'un échantillon d'EPS séché sous vide a également été testée. Cet EPS sec mis en solution dans de l'eau ultrapure à une concentration finale de 1% ou 2% reste toujours insoluble après neutralisation du pH et chauffage progressif de 30 °C à 100 °C. Dans ces conditions, nous avons observé une légère hydratation et un léger gonflement du polysaccharide.

D'autres résultats ont attiré également notre attention :

- Une augmentation du pH à 10,7 semble rendre le polymère plus soluble. Cela suggère la présence de substituants liés par une fonction esters, acétyle ou succinyle.
- Après sonication, l'EPS repasse sous forme de gel en chauffant l'échantillon à 80 °C. Ce comportement de reconstitution à température élevée suggère l'existence de liaisons hydrophobes avec une présence possible de lipides et/ou de glycolipides. Toutefois les analyses de la composition lipidique des échantillons d'EPS montrent un faible taux de lipides (1,5 %) (Annexe 3). De plus, après remise en suspension dans un mélange "chloroforme : méthanol" (2 : 1 v/v) qui extrait les lipides selon la méthode de Folch, l'échantillon reste intact après séchage et tentative de resuspension dans NaCl 0,1 M. Il reste insoluble même après neutralisation du pH, chauffage et sonication.

Finalement un moyen de solubilisation de l'EPS a été trouvé en utilisant directement du DMSO. C'est un solvant polaire organique capable de dissoudre à la fois les composés polaires et non-polaires et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau. De cette manière, il est possible d'obtenir une solution d'EPS en concentration finale de 0,4 %. La dissolution peut être accélérée par le chauffage de l'échantillon à 60 °C et sous forte agitation. Néanmoins, après dialyse, l'EPS revient à son état initial insoluble et donc, dans ces conditions, il n'est pas possible d'effectuer d'analyse rhéologique.

L'ensemble de ces résultats montre l'insolubilité de l'EPS de Rta et rend les analyses rhéologiques impossibles à réaliser. En effet, dans d'autres cas de polymères insolubles, comme par exemple la cellulose, la seule manière de faire des analyses rhéologiques est

de modifier la structure du polysaccharide. Cela est possible qu'une fois la structure de l'EPS connue. Donc, nous avons décidé de nous concentrer sur l'élucidation de la structure de l'EPS de Rta en gardant en tête les conclusions découlant des premiers résultats obtenus sur la solubilisation, notamment l'hypothèse que l'EPS de Rta possède à la fois des propriétés polaires et apolaires.

3.3. Caractérisation de l'EPS

Le caractère de fixation de l'EPS de Rta à la membrane externe de la cellule, son insolubilité dans de l'eau et en solution saline, sans oublier la position taxonomique de Rta laissent penser que sa structure est certainement très originale. Pour caractériser la structure d'un polysaccharide, il faut mettre en œuvre plusieurs analyses complémentaires pour combiner les résultats entre eux et définir la composition et l'enchaînement des monosaccharides et leur substituants dans l'unité répétée (oligosaccharide). Notamment dans ce paragraphe nous allons présenter des résultats sur la composition de l'EPS de Rta et faire des hypothèses sur la structure de l'unité répétée.

Les techniques que nous avons utilisées sont les suivantes : analyse élémentaire, dosages colorimétriques des monosaccharides totaux et des acides uroniques, analyses en CPG, spectrométrie de masse FTICR-MS, RMN, et HPLC (pour la détection des lipides). À partir de ces résultats, nous allons également définir la pureté de l'échantillon extrait et montrer des résultats sur la présence éventuelle des composés non-saccharidiques.

Les échantillons d'EPS utilisés pour l'analyse élémentaire, les dosages colorimétriques des monosaccharides totaux et des acides uroniques, les analyses en CPG et HPLC proviennent de cultures en fed-batch (cf. Chapitre 1, paragraphe 3.2.3., p. 85). Ces EPS ont été extraits et solubilisés selon le protocole décrit ci-dessus (Chapitre 2, paragraphe 3.1., Fig. 42, p. 99). Les échantillons d'EPS utilisés pour les analyses en spectrométrie de masse FTICR-MS et en RMN proviennent d'une culture obtenue en batch (milieu optimisé cf. Chapitre 1, paragraphe 2.3.2, page 54). L'extraction a été réalisée selon le protocole décrit plus loin dans Fig. 58 (p. 132).

3.3.1. Analyse élémentaire

Les polysaccharides sont des macromolécules constitués à partir des d'unités répétées de monosaccharides. Les monosaccharides identifiés dans la structure des EPS bactériens sont des hexoses ($C_6H_{12}O_6$) et des pentoses ($C_5H_{10}O_5$), ils ont une formule générale $C_nH_{2n}O_n$. De nombreux EPS contiennent également des acides uroniques. Les monosaccharides peuvent être associés à des groupements méthyle, acétyle, succinate, pyruvate. Plus rarement des substitutions avec un sulfate, phosphate, amine et amide sont présentes, ajoutant à cette composition de base du phosphore, du soufre et ou de l'azote.

L'analyse des principaux éléments (C, H, O, N) de l'EPS de Rta a été réalisée par l'Institut des Sciences Analytiques (CNRS, Villeurbanne). Nous avons également demandé de quantifier le chlore en raison de l'utilisation du TCA lors de l'extraction de l'EPS et les risques de son élimination incomplète. Effectivement, nous mettons en évidence une quantité importante en Cl représentant en moyenne environ 33 % dans l'échantillon (Fig. 43). De toutes évidences, le TCA n'a pas suffisamment été éliminé.

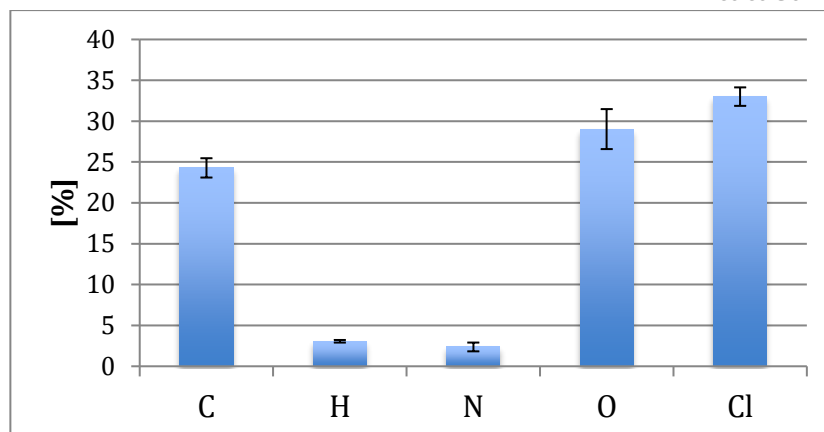


Figure 43 : Composition élémentaire massique en C, H, O, N et Cl de l'EPS de Rta. Les échantillons d'EPS utilisés sont trois répétitions provenant des extractions, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1., chapitre 2 (Fig. 42), à partir des trois cultures obtenues en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Si l'on considère que le chlore contenu dans l'EPS est sous forme de TCA, après soustraction des éléments constituant le TCA (Cl mais aussi C, H et O), il reste en moyenne 16,8 % de C, 19,1 % d'O et 2,8 % de H, soit un pourcentage total pour l'EPS de 38,7%. En calculant le ratio de chaque de ces éléments par rapport à leur somme (CHO) et après soustraction du TCA, on obtient 43,6 % de C, 49,3 % d'O et 7,1% de H (Fig. 44).

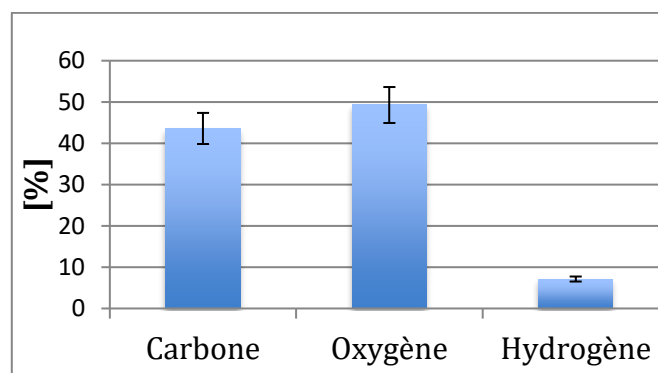


Figure 44 : Composition élémentaire massique en C, H et O de l'EPS de Rta après la soustraction du TCA. Les échantillons d'EPS utilisés sont trois répétitions provenant des extractions, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1., chapitre 2 (Fig. 42), à partir de trois cultures obtenues en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Ces ratios ont été comparés à quelques ratios d'unités osidiques et de deux acides gras (Tableau 10). Ils permettent d'exclure que la molécule étudiée puisse être un acide gras et ils confirment qu'il s'agit bien d'une molécule constituée d'unités osidiques. Une analyse plus fine semble indiquer que ces ratios correspondent davantage à des unités répétées formées d'hexoses et de pentoses voire de déoxy-hexoses substitués par un radical acétyle ou autre acide organique.

Tableau 10: Comparaison de la composition élémentaire massique en C, H, O de l'EPS de Rta avec certains exemples de monosaccharides substitués ou pas, des oligosaccharides, ainsi que de

deux acides gras. La contribution en C, H et O de la contamination de l'échantillon avec le TCA a été soustraite pour le calcul de ces pourcentages.

	C/CHO (%)	H/CHO (%)	O/CHO (%)
EPS Rta	43,6	7,1	49,3
Methyl-hexose /Acetyl deoxy-hexose ($C_7H_{14}O_6$)	43,3	7,2	49,5
Methyl-pentose /Déoxy-hexose ($C_6H_{12}O_5$)	43,9	7,4	48,7
Acetyl-pentose ($C_7H_{12}O_6$)	43,8	6,3	49,9
Acetyl-hexose ($C_8H_{14}O_7$)	43,2	6,4	50,4
Hexose/Pentose ($C_6H_{12}O_6$ / $C_5H_{10}O_5$)	40,0	6,7	53,3
Hexose pyruvate ($C_9H_{14}O_8$)	43,2	5,6	51,2
Pentose pyruvate ($C_8H_{12}O_7$)	43,4	5,9	50,6
Glycan-pentasaccharide ($C_{30}H_{48}O_{26}$)	43,7	5,8	50,5
Hexasaccharide ($C_{36}H_{58}O_{31}$)	43,8	5,9	50,2
Hexadecanoic acid ($C_{16}H_{32}O_2$)	74,9	12,6	12,5
Octadecenoic acid ($C_{18}H_{34}O_2$)	76,0	12,8	11,2

L'analyse élémentaire donne également des informations sur la présence d'azote dans les échantillons (2,4% de $CHNO+Cl$, Fig. 43). Il est possible que cet élément provienne de peptides ou de protéines membranaires solubilisées lors de l'extraction. Une deuxième hypothèse est que l'EPS de Rta possède des groupes amines ou amides comme substituants de monosaccharides ou des acides aminés dans son unité répété.

L'ensemble de ces résultats indique que l'EPS extrait n'est pas pur (présence importante de TCA), **mais que la composition de l'unité répétée est certainement de nature saccharidique** avec peut-être des substitutions par exemple avec des groupements acétyles.

3.3.2. Composition en monosaccharides et leur quantification (CPG et analyses colorimétriques)

Sur la base de l'analyse élémentaire, l'unité répétée de l'EPS de Rta est de nature saccharidique. Une analyse colorimétrique par la méthode de Dubois *et al.* (1956), a permis de mettre en évidence que l'EPS contient 42% d'oses réducteurs, en cohérence avec le pourcentage fourni par l'analyse élémentaire (38,7 %).

Pour aller plus dans la caractérisation de la composition en monosaccharides, nous avons effectué une analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG). Cette analyse est compatible avec la présence de TCA car seuls les monosaccharides peuvent être dérivatisés dans le prétraitement des échantillons, avant injection dans le chromatographe.

3.3.2.1. Analyse en CPG en hydrolysant l'EPS de Rta par l'acide sulfurique

Pour la première analyse en CPG, réalisée sous la direction de Catherine GARNIER et Sophie LE GALL (BIA, INRA, Nantes), nous avons utilisé trois échantillons d'EPS de Rta, provenant de trois cultures indépendantes produites en fed-batch dans le milieu

optimisé (cf. Chapitre 1, paragraphe 3.2.3.) et extraits selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1., chapitre 2 (Fig. 42). Les échantillons sont tout d'abord hydrolysés avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4 13 M, puis 1 M), permettant de libérer les monosaccharides des unités répétées, puis dérivatisés et enfin injectés dans une colonne de CPG (TG-225 GC).

Outre le standard interne (inositol) et un pic artéfactuel, pour chacun des trois échantillons analysés nous avons détecté cinq hexoses dont deux majoritaires : glucose (Glc), galactose (Gal), et trois minoritaires : mannose (Man), xylose (Xyl) et arabinose (Ara) (Fig. 45). Un cinquième pic important, correspondant à du ribose (Rib), a également été mis en évidence. La présence de ribose dans l'EPS de Rta demande à être vérifiée par d'autres méthodes dans la mesure où ce pentose est rarement présent dans les EPS bactériens décrits dans la littérature.

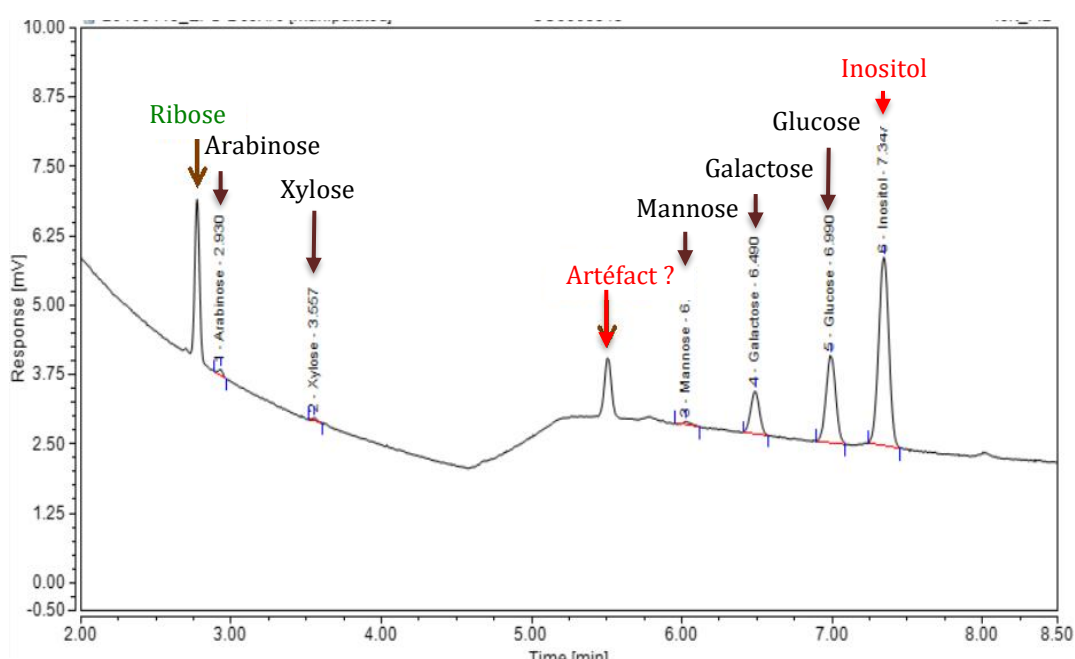


Figure 45 : Profil chromatographique (CPG) de la composition osidique de l'unité répétée de l'EPS de Rta, prétraité par une hydrolyse à l'acide sulfurique 13 M et puis traité à l'acide sulfurique 1 M, 2 h, 100 °C. L'analyse est effectuée sur un échantillon extrait de culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1) et extrait selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42). Les pics majeurs détectés correspondent aux monosaccharides : ribose, glucose, galactose, les pics mineurs sont ceux de xylose, arabinose, mannose. Le standard interne est l'inositol.

L'analyse en CPG permet également de quantifier les différents monosaccharides détectés. Ainsi, en connaissant la quantité d'échantillon utilisé pour une analyse, nous pouvons calculer la quantité finale de chaque ose dans l'EPS. De cette façon nous retrouvons dans les échantillons le glucose et le galactose qui sont les monosaccharides majoritaires, représentant respectivement environ 7,7 % et 3,0 % en moyenne (Fig. 46). Les autres monosaccharides sont en quantité plus faible, le mannose représentant environ 0,4 %, l'arabinose 0,2 % et le xylose 0,3 % (Fig. 46). Toutes les quantités

estimées ont une très faible variabilité d'un échantillon à l'autre et nous pouvons en conclure que les différentes répétitions de fermentation et les extractions ont été réalisées de façon reproductible. Le pourcentage massique total de tous les monosaccharides est d'environ 12 %. Donc le reste des monosaccharides (selon l'analyse élémentaire 38,5% ou selon le test colorimétrique 42 %) n'a pas été identifié par cette méthode. Le ribose est probablement présent dans les échantillons mais sa présence doit être validée par une analyse incluant le ribose comme standard interne, condition pour pouvoir calculer son pourcentage dans l'EPS. La différence entre ces valeurs peut provenir d'un faible rendement d'hydrolyse et de dérivatisation (environ 50%) ou d'une identification incomplète des constituants de l'unité répétée (*e.g.* acides uroniques/oses oxydés).

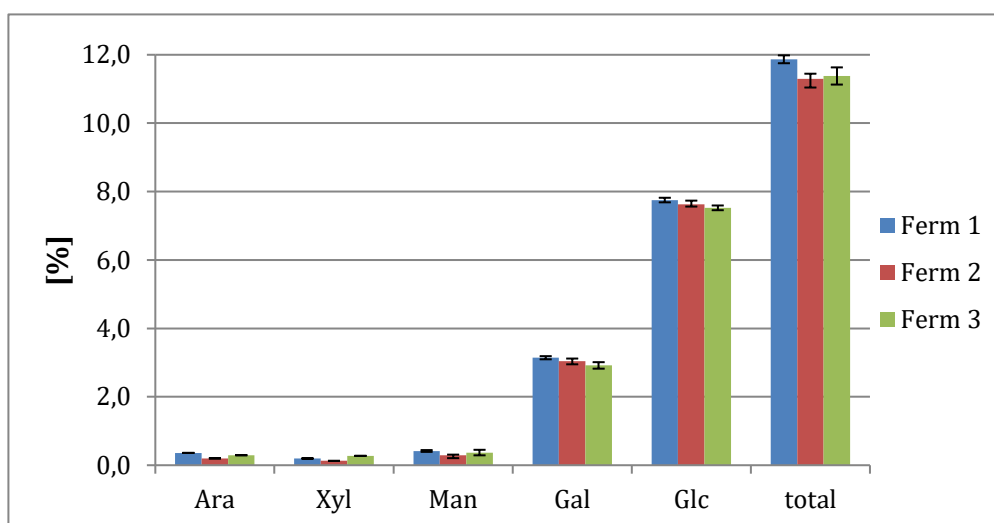


Figure 46 : Pourcentage massique de glucose, galactose, arabinose, xylose, mannose dans les échantillons d'EPS de *Rta* issus de trois cultures bactériennes indépendantes en fed-batch. Les échantillons d'EPS proviennent d'extraction, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir de trois cultures de *Rta* obtenues en fed-batch (Ferm 1, 2 et 3) dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

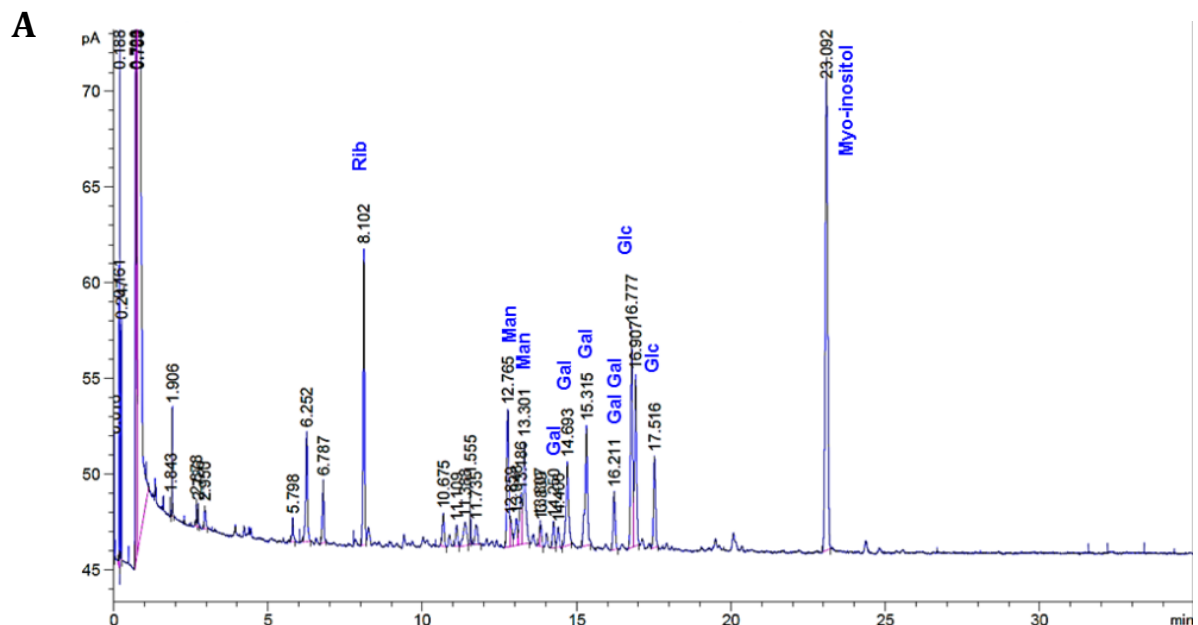
Pour vérifier cette dernière hypothèse concernant la possibilité de présence d'acide uronique dans l'unité répétée, nous avons recherché sa présence en utilisant un test colorimétrique spécifique par la méthode au métahydroxydiphényl (Blumenkrantz et Asboe-Hansen, 1973). Cette méthode n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'acide uronique.

Compte tenu des concentrations très faibles en mannose, arabinose et xylose (10 à 20 fois plus faibles que celles du glucose et du galactose), à ce stade de notre analyse **nous retenons de façon certaine, comme monosaccharides impliqués dans l'unité répétée, le glucose et le galactose (ratio 2,5:1 correspondant à 7,7 vs 3,0 %) avec une présence de ribose qui reste à valider.**

3.3.2.2. Analyse en CPG en hydrolysant l'EPS de Rta par méthanolyse

Nous avons décidé de faire une autre analyse en CPG d'un seul des trois échantillons d'EPS de Rta, sachant que nous avons vu précédemment que les trois répétitions étaient très homogènes. Cette analyse a été réalisée par Claire BOISSET-HELBERT (CERMAV, CNRS, Univ. Grenoble-Alpes). La méthode d'hydrolyse est différente de la précédente puisqu'il s'agit ici d'une méthanolyse, et non pas d'une attaque à l'acide sulfurique. C'est une méthode efficace, présentant une conversion quasi-totale des monosaccharides en méthylglycosides stables en solution (Chambers et Clamp, 1971). Deux conditions ont été testées. La première est une méthanolyse faible avec MeOH/HCl 2 N et la deuxième, plus forte, utilisant MeOH/HCl 3 N.

Quelles que soient les conditions de méthanolyse, nous observons la présence avec certitude de **ribose, glucose, galactose et mannose** (Fig. 47A et B). Par rapport à l'analyse en CPG précédente, nous confirmons la présence de ces 4 oses, alors que nous avions un doute concernant le ribose et le mannose.



B

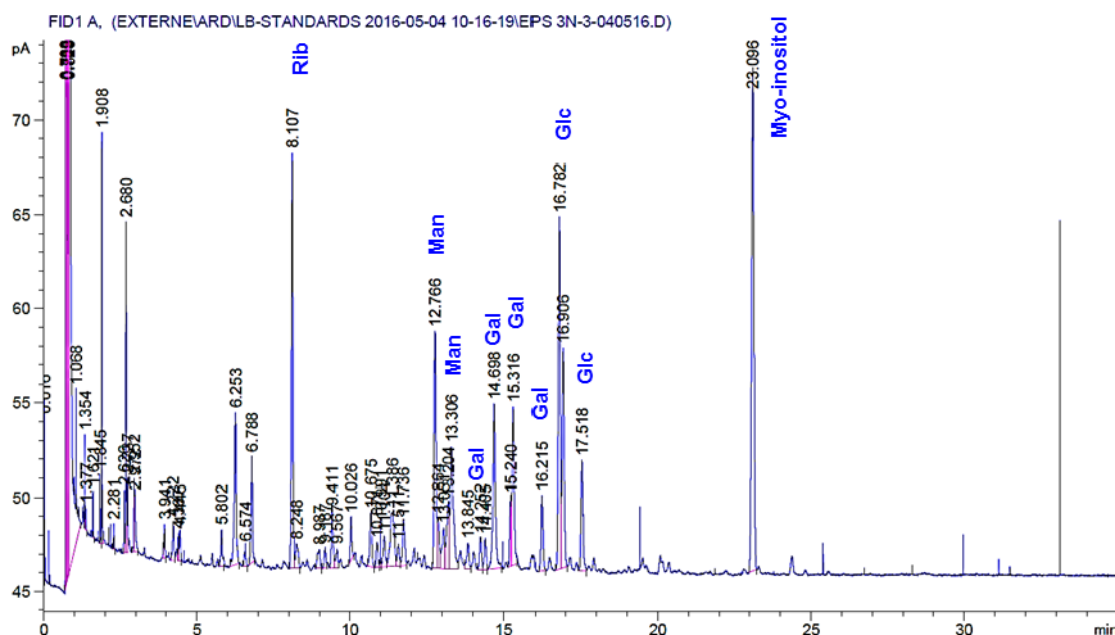


Figure 47 : Profils chromatographiques en CPG de l'EPS de Rta hydrolysé par une méthanolyse utilisant A) MeOH/HCl 2 N et B) MeOH/HCl 3 N. Les échantillons d'EPS ont été extraits selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir d'une culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1). Les monosaccharides détectés dans A) et B) sont le ribose, glucose, galactose et mannose. Le standard interne est le myo-inositol.

Il est intéressant de noter dans le chromatogramme un certain nombre de pics qui ne correspondent pas à des standards et ne sont donc pas identifiés (Fig. 47A et B). La présence de ces pics peut être expliquée par plusieurs raisons. Par exemple il peut s'agir de monosaccharides ne correspondant pas aux molécules "standard" utilisées. Il est également possible que ce soit des monosaccharides liés à des substituants qui n'ont pas été libérés après l'hydrolyse. Ces molécules peuvent également être non-osidiques portant des hydroxyles qui permettent leur silylation et par la suite leur élution.

Selon cette deuxième analyse en CPG, le pourcentage total des monosaccharides majoritaires identifiés est de 12-14 % se répartissant pour l'extraction la plus efficace (MeOH/HCl 2N) de la façon suivante ribose (5,2%), glucose (4,2 %), galactose (2,8 %) et mannose (1,7 %) (Fig. 48).

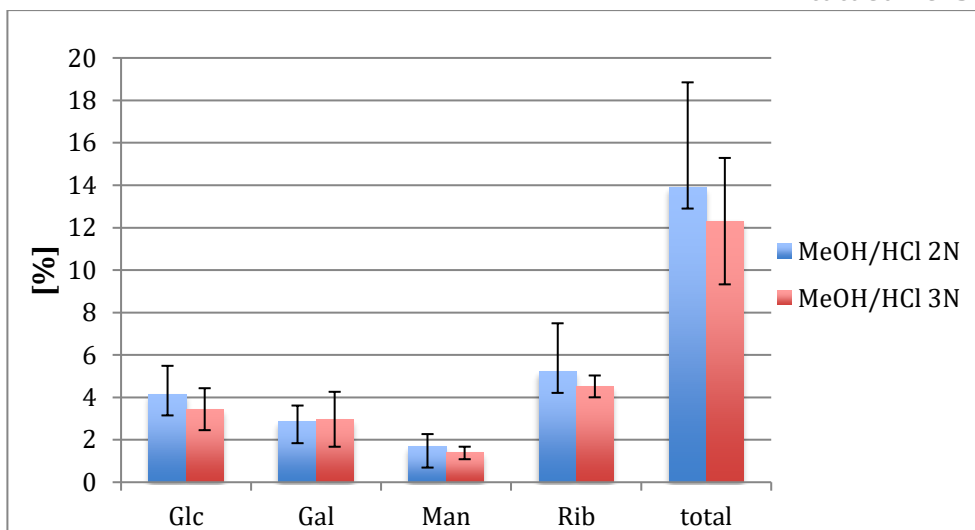


Figure 48 : Pourcentage massique de glucose, galactose, ribose, mannose et pourcentage massique total en monosaccharides présents dans l'échantillon d'EPS de Rta selon l'analyse CPG. L'échantillon est hydrolysé par une **méthanolyse** utilisant MeOH/HCl 2 N ou MeOH/HCl 3 N. Cet échantillon d'EPS provient d'extraction, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir d'une culture de Rta obtenue en fed-batch (Ferm 1, 2 et 3) dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Le ratio des quatre oses Rib : Glc : Gal : Man est en moyenne des deux méthanolyses le suivant : 1,5 : 1,0 : 0,7 : 0,4 (pouvant être simplifié par 3/2/1/1). Dans cette expérience, le ratio entre Glc et Gal (1,0 : 0,7) est différent du précédent (2,5 : 1,0).

Globalement nous constatons que la méthanolyse est une hydrolyse plus douce comparée à l'hydrolyse à l'acide sulfurique, puisque le pourcentage massique d'oses totaux extraits est de 12-14 %, à comparer avec environ 11,5 % (ribose non compris) extraits dans l'analyse CPG précédente. Par contre, cette méthode (méthanolyse) nous semble fournir des résultats plus fiables en ce qui concerne la composition en monosaccharides, avec encore une interrogation concernant le ribose et à laquelle nous essayons de répondre dans le paragraphe suivant.

3.3.2.3. Quantification des ARN dans les échantillons d'EPS de Rta

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la présence de ribose dans l'unité répétée, si elle est avérée, serait un élément très original de l'EPS de Rta. En effet, à ce jour, la présence de ribose dans un EPS bactérien n'a été mise en évidence que chez quelques bactéries telles que *Streptococcus thermophilus* (Faber *et al.*, 2002), *Pseudomonas putida* (Kachlany *et al.*, 2001) et surtout des cyanobactéries telles que *Nostoc*, *Oscillatoria* et *Cyanothece* (Parikh et Madamwar, 2006), ainsi que *Synechocystis* (Fisher *et al.*, 2013).

Enfin chez les organismes vivants, le ribose est un ose essentiellement présent dans la structure d'ARN. Les ribosomes contenus les ARN auraient dû être éliminés avec le culot cellulaire lors de la centrifugation qui suit le décollement de l'EPS. Prenant en compte le fait que nous avons utilisé du TCA pour séparer l'EPS de la membrane externe et que le

TCA peut précipiter les acides nucléiques (formés de plus que 20 nucléotides), l'hypothèse d'une origine ribosomique du ribose (détecté en CPG) est peu plausible mais méritait d'être testée.

Tout d'abord nous avons essayé de remettre l'EPS le plus possible en solution dans de l'eau ultrapure. L'absorbance de l'EPS en solution a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanovue). Nous observons deux pics à 260 et 210 nm compatibles avec un spectre des quatre types de nucléotides montrant ainsi la présence d'ADN et/ou d'ARN dans l'échantillon (Fig. 49).

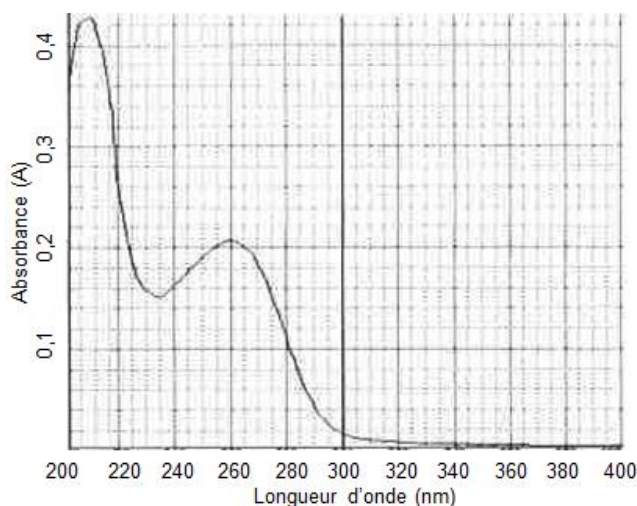


Figure 49 : Spectre d'absorbance de l'EPS de Rta mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre (NanoVue) montrant deux pics à 260 nm et à 210 nm. L'échantillon d'EPS a été extrait selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1., Chapitre 2 (Fig. 42), à partir d'une culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1).

Nous avons effectué une deuxième expérience pour quantifier l'ARN ribosomique (ARNr) potentiellement présent dans l'échantillon. Dans les cellules bactériennes, l'ARNr représente la majorité des ARN (environ 80%). Pour cela nous avons effectué un gel d'électrophorèse afin de révéler les bandes correspondant à l'ARNr 16S et 23S. Le seuil de sensibilité est de 30 $\mu\text{g/mL}$ d'ARNr avec deux bandes de très faible intensité, par comparaison aux bandes obtenues avec 60 $\mu\text{g/mL}$ d'ARNr (Fig. 50). En dessous de cette valeur de 30 $\mu\text{g/mL}$ d'ARNr, nous n'avons pas pu détecter de bandes fluorescentes. Aux trois concentrations d'EPS testées (1,0, 1,2 et 2,3 mg/mL), aucune bande n'est observable. L'échantillon d'EPS de Rta (2,3 mg/mL) contient donc moins de 30 $\mu\text{g/mL}$ d'ARNr (Fig. 50), ce qui représente moins d'1% d'ARNr dans l'EPS (w/w). Sachant que le ribose représente en masse 30% d'un ARNr, nous pouvons en conclure que les traces d'ARNr mises en évidence par spectrophotométrie correspondent au maximum à 0,3% du ribose détecté dans l'EPS de Rta. Cette valeur est à comparer avec les 5,2 % de ribose détectés par l'analyse en CPG par méthanolyse.

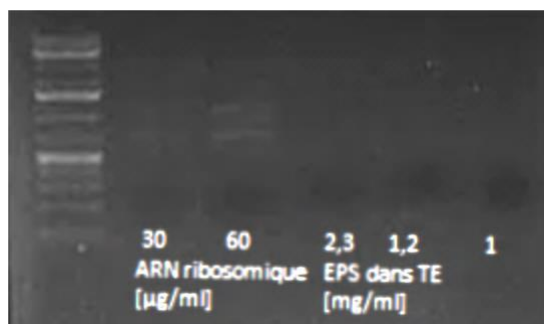


Figure 50 : Gel d'électrophorèse pour la détection d'ARN ribosomique dans l'EPS de Rta. Deux standards de 30 et 60 µg/mL d'ARNr et trois solutions d'EPS 2,3 mg/mL, 1,2 mg/mL et 1 mg/mL dans le tampon TE sont déposés. L'échantillon d'EPS a été extrait selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1., Chapitre 2 (Fig. 42), à partir d'une culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1).

Finalement nous avons utilisé le dosage par le kit "Quant-iT™ RiboGreen® RNA Assay Kit" pour vérifier la présence d'ARN dans l'EPS de Rta. C'est une méthode très sensible, basée sur la coloration fluorescente des acides nucléiques, permettant de détecter l'ARN à partir d'1 ng/mL. Pour ce dosage, nous avons resuspendu 1 mg de l'EPS de Rta dans 1 mL de tampon TE, puis effectué des dilutions. Le pH de l'échantillon d'EPS non dilué qui est environ de 4,4, augmente dans les dilutions à environ 6,8. Cela nous permet de comparer les résultats à la courbe d'étalonnage. Avec cette méthode de dosage, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence d'ARN.

En conclusion, l'éventuelle contribution du ribose provenant des ARN (au maximum 0,3%) ne peut représenter les 5 % du ribose total de l'EPS de Rta dosé par CPG.

En **conclusion** de cette partie consacrée à la détermination de la composition de l'unité répétée de l'EPS de Rta par CPG : malgré la présence de TCA dans les échantillons et un rendement de d'extraction/purification de l'EPS faible (15-20% maxi de monosaccharides totaux), **nous avons mis en évidence la présence de quatre monosaccharides majoritaires : ribose, glucose, galactose et mannose.**

3.3.3. Composition élémentaire par FTICR-MS

Pour aller plus loin dans l'analyse de la composition biochimique de l'EPS, nous avons bénéficié d'une collaboration avec le Dr. Mourad HARIR (Research Unit Analytical BioGeoChemistry, Department of Environmental Sciences, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Allemagne) qui a réalisé une analyse par spectrométrie de masse en FTICR-MS (Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectroscopy) avec ionisation en mode négatif, couplée à la technique de nanospray (ESI pour *Electrospray Ionization*).. L'interprétation des données a été effectuée par Catherine SANTAELLA (LEMIRE).

La FT-ICR-MS est une spectroscopie résolutive et exacte qui détermine la masse d'un composé au niveau isotopique avec une erreur inférieure ± 1 ppm et permet l'identification de la formule chimique brute des ions. Cette technique ne nécessite qu'une très faible concentration en molécules à analyser, et elle est particulièrement adaptée pour analyser des mélanges tels que des métabolomes (ensemble de métabolites). La comparaison des masses expérimentales traduites en formules brutes avec celles de banques de données peut permettre d'attribuer des structures moléculaires correspondant à ces masses. Avec l'instrument disponible au HZM et les

conditions opératoires, la gamme de masses accessibles est large, de l'ordre de 100 à 1500 Da.

En raison de la masse molaire élevée des EPS (de l'ordre de 10^6 g/mol), nous ne pouvons pas analyser directement les échantillons d'EPS de Rta par FTICR-MS. Pour fragmenter l'EPS en oligosaccharides, un échantillon d'EPS de Rta (culture en batch TSB/10 + lactate 10 mM, extraction selon le protocole décrit dans la Fig. 58 p. 131), a été prétraité par sonification dans du H_2SO_4 5% pendant 3 min à température ambiante. Les sels sont éliminés par purification sur une colonne SPC18 éluée avec du MeOH. L'éluat dilué dans du MeOH est infusé en FTICR-MS avec ionisation en mode négatif, couplée à la technique de nanospray (ESI pour *Electrospray Ionization*). Cette méthode permet d'ioniser négativement les oligosaccharides en arrachant un proton pour former l'ion moléculaire $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Dans le cas des monosaccharides, en l'absence d'anions de type chlorure, nitrate ou autre, cet ion $[\text{M}-\text{H}]^-$, est instable et produit de nombreux ions fragments de source interne (Harvey, 2005 part 1). En ionisation négative, les coupures attendues sont de type C ou 0,2A (nomenclature de Domon et Costello, 1988), avec possibilité de réarrangement des fragments C en fragments B, par déshydratation (perte de masse de -18 Da) (Li *et al.*, 2005 ; Pérez *et al.*, 2008).

L'exemple ci-dessous montre le réarrangement pour un ion positif (Pérez *et al.*, 2008), mais il est identique pour un ion négatif.

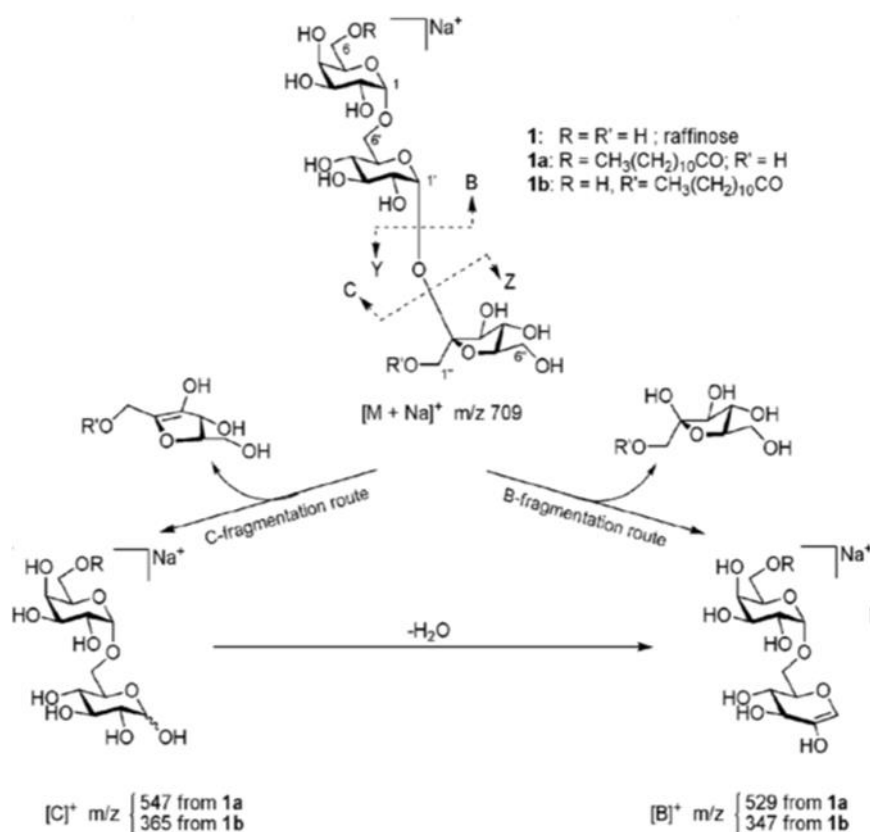


Figure 51: Fragmentation d'un ion $[\text{M} + \text{Na}]^+$ par coupure B ou C et réarrangement par déshydratation (d'après Pérez *et al.*, 2008).

Classiquement, l'interprétation d'un spectre de masse consiste à identifier l'ion moléculaire, qui correspond à la molécule ionisée. Cet ion est généralement le plus lourd, mais pas toujours. Si le pic moléculaire est intense, on peut détecter des pics plus lourds correspondant aux motifs isotopiques $M+1$, $M+2$... De plus, ce pic n'est pas toujours détecté : l'intensité peut être faible et le signal noyé dans le bruit de fond, la molécule ionisée peut également être fragile et se fragmenter rapidement (Dalmeyda et David, 2000)¹.

La deuxième façon d'interpréter le spectre est d'identifier des fragments neutres, correspondant à la perte d'un motif reliant deux m/z .

La troisième consiste à interpréter chaque m/z en attribuant une formule brute et une structure, et relier ces m/z en utilisant l'information sur la perte de masse neutre entre deux fragments.

Il faut noter que ce mode d'interprétation n'est pas classique en FTICR-MS, la technique ne générant que très peu de fragmentation, et encore moins pour l'analyse d'un mélange de composés. Dans notre cas, la fragmentation est due à l'instabilité des ions moléculaires, les monosaccharides étant analysés en mode négatif en l'absence d'anions stabilisateurs.

Le spectre de masse obtenu en FTICR-MS pour l'EPS de Rta est complexe, contenant plus de 6 millions de pics. Le pic moléculaire lui-même n'a pas pu être repéré. Le traitement des données s'est effectué en plusieurs étapes.

Tout d'abord, pour chaque pic m/z détecté, d'intensité supérieure au bruit de fond, le calcul d'une formule brute élémentaire a été réalisé en utilisant un script écrit en interne, avec une tolérance entre la masse détectée et la masse théorique, inférieure à ± 1 ppm. Cette tolérance est calculée par la formule suivante :

$$(M \text{ expérimentale} - M \text{ théorique}) \times 10^6 / M \text{ théorique}$$

La masse théorique est calculée sur la base de la formule brute de l'ion (<http://www.chemcalc.org/>; Patiny et Borel, 2013). Sur ce site, la masse théorique de l'ion est libellée "masse monoisotopique expérimentale" et tient compte de la charge négative.

Sur la base d'un diagramme de Van Krevelen "ratio H/C vs ratio O/C" (Fig. 52A) et d'une représentation du ratio H/C vs m/z (Fig. 52B), seuls les signaux m/z correspondant à des composés de type carbohydrates (mono- et oligosaccharides) ont été sélectionnés, générant un tableau de 32 composés, caractérisés par leur masse et une formule brute potentielle, de type CHO.

¹ (Dalmeyda et David, 2000) ¹ Exercices dirigés de spectrométrie de masse, almeyda.chez.com/cours/spectrodemasse/interpretation-ms.pdf

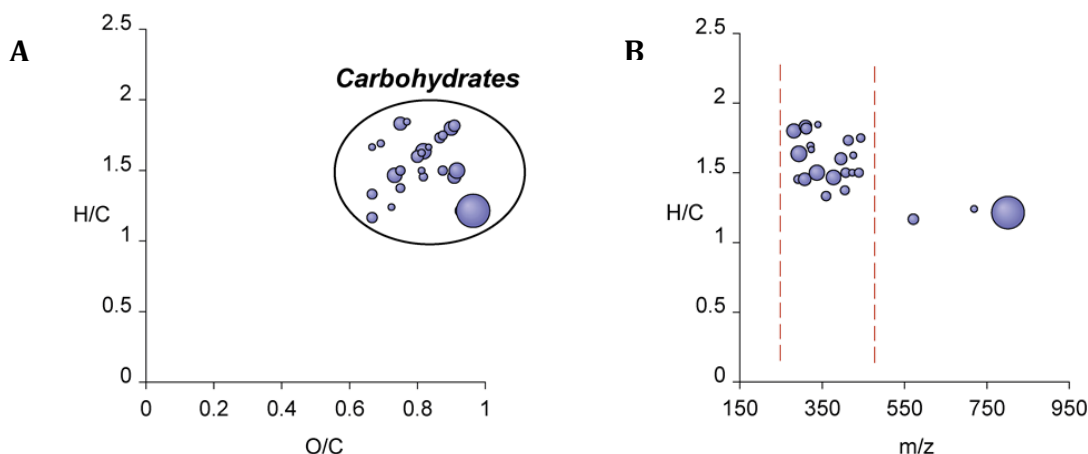


Figure 52 : Sélection des carbohydrates dans les échantillons d'EPS de Rta parmi les masses obtenus en FTICR-MS : A) Diagramme de Van Krevelen estimant le ratio H/C comme fonction d'O/C qui permet de sélectionner les masses proches de la formule $C_nH_{2n}O_n$ B). Un deuxième traitement des résultats qui permet d'exclure les molécules avec des ratios H/C en fonction de ratio masse/charge (m/z) incohérents avec les ratios attendus pour les carbohydrates.

Pour chacune des 32 formules brutes correspondant aux ions m/z , nous avons recherché dans des bases de données (ChemSpider², PubChem³) des attributions de structures potentielles correspondant à des mono- et oligosaccharides, en considérant que ces formules brutes proviennent de différents cas de figure :

- Perte d'un proton et formation de $[M-H]^-$
- Perte d'un proton, déshydratation et formation de $[M-H_2O-H]^-$
- Perte d'un proton, fragmentation 0,2A et formation de $[M-C_2H_4O_2-H]^-$
- Perte d'un proton, fragmentation 0,2A, déshydratation et formation de $[M-C_2H_4O_2-H_2O-H]^-$.

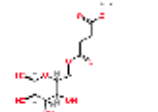
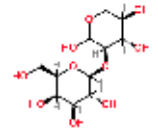
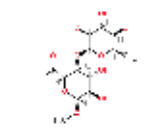
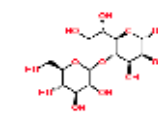
Un tableau a été généré et complété avec des structures possibles générées par une recherche de correspondance des m/z dans la base Metlin⁴, en mode négatif sur la base d'ions formés $[M-H]^-$ et $[M-H_2O-H]^-$. Ce tableau contient plus de 120 composés potentiels pour lesquelles les attributions de structures peuvent être converties en modules moléculaires équivalents. Ces mêmes composés ont généré une liste de formules brutes correspondant à des pertes de masse neutres ($M-H_2O$). Un exemple d'une ligne de ce tableau est présenté dans le Tableau 11.

² <http://www.chemspider.com>

³ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/>

⁴ https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage

Tableau 11: Recherche de structures potentielles correspondant au pic m/z = 293.0877

Masse expérimentale	Intensité	Masse monoisotopique théorique pour l'ion négatif	Erreur ppm	Formule brute de l'ion négatif	Ion correspondant	Formule brute du composé M	Recherche d'homologues dans Chem Spider	Equivalent de structure en modules	Nombre de structures dans Chem Spider	Formule [M-H ₂ O]	Masse monoisotopique [M-H ₂ O]	N° ID
293.08778	1.6E+07	293.08781	-0.1	C ₁₁ H ₁₇ O ₉	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₈ O ₉	 6-O-(4-Methoxy-4-oxobutanoil)-α-D-galactopyranose	Succinyl+ (OAc) + Hexose	22	C ₁₁ H ₁₆ O ₈	276.08452	23
					[M-H ₂ O-H] ⁻	C ₁₁ H ₂₀ O ₁₀	 Galactopyranosyl-D-xylose	Pentopyranosyl-hexopyranose	70	C ₁₁ H ₁₈ O ₉	294.09513	24
					[M-C ₂ H ₄ O ₂ -H] ⁻	C ₁₃ H ₂₂ O ₁₁	 Methyl 4-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl)-α-D-glucopyranosiduronic acid	OMe+ 6-Deoxyhexose+ UA	8	C ₁₃ H ₂₀ O ₁₀	336.10570	26
					[M-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-H] ⁻	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₂	 β-D-Glcp-(1->4)-L-α-D-Hepp	Hexose-Heptitol	9	C ₁₃ H ₂₂ O ₁₁	354.11627	25

Cette base de données a été complétée en ajoutant les motifs/substituants les plus caractéristiques des monosaccharides, dont quelques exemples sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Ions caractéristiques de monosaccharides. Pour faciliter la lecture, les masses ont été arrondies à l'unité.

Motif ou substituant	Masse molaire	[M-H]-	[M - H ₂ O]	[M-H ₂ O-H]-
Hexose	180	179	162	161
Acide uronique (UA)	194	193	176	175
Pentose	150	149	132	131
Désoxyhexose	164	163	146	145
Acétate ooo	60	59	42	41

Des pertes de masses "types" correspondant à des fragmentations classiques des monosaccharides ont été ajoutées à la base de données (Tableau 13). Certains schémas de fragmentation révèlent le type d'enchaînement des monosaccharides (1,2 ; 1,3 ; 1,4 : 1,6) (Garozzo, 1990).

Tableau 13 : Pertes de masse correspondant à des fragmentations de monosaccharides

Fragmentation	Perte de masse (uma)	Formule brute
0,1A	30	CHO
0,2A	60	C ₂ H ₄ O ₂
2,4A	120	C ₄ H ₆ O ₄
0.4A	90	C ₃ O ₃ H ₆

Au total, un tableau de 180 motifs neutres de pertes de masse a été ainsi généré (Annexe 5).

Après avoir généré ces bases de données, la liste des 32 m/z a été utilisée pour construire une matrice de distance de chaque m/z par rapport aux autres. Puis, la liste des pertes de masses (motifs neutres) a été utilisée pour rechercher des motifs dans la matrice de distance. Cette recherche s'effectue avec une précision de 5 chiffres après la virgule. Un exemple de recherche de motifs dans la matrice de distance est illustré dans la Figure 53.

m/z	801	785	783	783	719	571	443	439	427	425	423	413	407	405	395	377	359	339	337	323	311	309	307	293	291	291	281	275	263	175	161
801	0	0	0	18	0	0	0	362	0	0	378	0	394	396	406	424	442	0	464	478	490	492	494	508	510	510	520	526	538	626	640
785	0	0	0	2	0	0	0	346	0	0	362	0	378	380	390	408	426	0	448	462	474	476	478	492	494	494	504	510	522	610	624
783	0	0	0	0	0	212	0	344	0	358	360	370	376	378	388	406	424	444	446	460	472	474	476	490	492	492	502	508	520	608	622
783	-18	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	476	0	0	0	0	0	0	608	622
719	0	0	0	0	0	148	276	280	292	294	296	306	312	314	324	342	360	380	382	396	408	410	412	426	428	428	438	444	456	544	558
571	0	0	-212	0	-148	0	0	132	0	146	148	158	164	166	176	194	212	232	234	248	260	262	264	278	280	280	290	296	308	396	410
443	0	0	0	0	-276	0	0	4	0	18	20	30	36	38	48	66	84	104	106	120	132	134	136	150	152	152	162	168	180	268	282
439	-362	-346	-344	0	-280	-132	-4	0	0	0	0	0	0	34	0	62	80	0	102	116	128	0	132	146	148	148	158	164	176	264	278
427	0	0	0	0	-292	0	0	0	0	2	4	14	20	22	32	50	68	88	90	104	116	118	120	134	136	136	146	152	164	252	266
425	0	0	-358	0	-294	-146	-18	0	-2	0	2	0	18	20	30	48	66	86	88	102	114	116	118	132	134	134	144	150	162	250	264
423	-378	-362	-360	0	-296	-148	-20	0	-4	-2	0	0	0	18	0	46	64	0	86	100	112	0	116	130	132	132	142	148	160	248	262
413	0	0	-370	0	-306	-158	-30	0	-14	0	0	0	6	8	18	36	54	74	76	90	102	104	106	120	122	122	132	138	150	238	252
407	-394	-378	-376	0	-312	-164	-36	0	-20	-18	0	-6	0	2	0	30	48	0	70	84	96	98	100	114	116	116	126	132	144	232	246
405	-396	-380	-378	0	-314	-166	-38	-34	-22	-20	-18	-8	-2	0	0	46	0	68	82	94	0	98	112	0	114	124	130	142	230	244	
395	-406	-390	-388	0	-324	-176	-48	0	-32	-30	0	-18	0	0	0	18	36	0	58	72	84	86	88	102	104	104	114	120	132	220	234
377	-424	-408	-406	0	-342	-194	-66	-62	-50	-48	-46	-36	-30	0	-18	0	18	0	40	54	66	0	70	84	86	86	96	102	114	202	216
359	-442	-426	-424	0	-360	-212	-84	-80	-68	-66	-64	-54	-48	-46	-36	-18	0	0	22	36	48	0	52	66	0	68	78	84	96	184	198
339	0	0	-444	0	-380	-232	-104	0	-88	-86	0	-74	0	0	0	0	0	0	0	2	16	28	30	32	46	48	48	58	64	164	178
337	-464	-448	-446	0	-382	-234	-106	-102	-90	-88	-86	-76	-70	-68	-58	-40	-22	-2	0	0	0	0	30	0	0	46	0	62	74	162	176
323	-478	-462	-460	0	-396	-248	-120	-116	-104	-102	-100	-90	-84	-82	-72	-54	-36	-16	0	0	12	0	16	30	0	32	42	48	60	148	162
311	-490	-474	-472	0	-408	-260	-132	-128	-116	-114	-112	-102	-96	-94	-84	-66	-48	-28	0	-12	0	0	4	18	0	20	30	36	48	136	150
309	-492	-476	-474	0	-410	-262	-134	0	-118	-116	0	-104	-98	0	-86	0	0	-30	0	0	0	0	2	16	18	18	28	34	46	134	148
307	-494	-478	-476	-476	-412	-264	-136	-132	-120	-118	-116	-106	-100	-98	-88	-70	-52	-32	-30	-16	-4	-2	0	0	0	0	0	0	0	132	146
293	-508	-492	-490	0	-426	-278	-150	-146	-134	-132	-130	-120	-114	-112	-102	-84	-66	-46	0	-30	-18	-16	0	0	0	2	0	18	30	118	132
291	-510	-494	-492	0	-428	-280	-152	-148	-136	-134	-132	-122	-116	0	-104	-86	0	-48	0	0	0	-18	0	0	0	10	16	28	116	130	
291	-510	-494	-492	0	-428	-280	-152	-148	-136	-134	-132	-122	-116	-114	-104	-86	-68	-48	-46	-32	-20	-18	0	-2	0	0	0	0	0	116	130
281	-520	-504	-502	0	-438	-290	-162	-158	-146	-144	-142	-132	-126	-124	-114	-96	-78	-58	0	-42	-30	-28	0	0	-10	0	0	6	18	106	120
275	-526	-510	-508	0	-444	-296	-168	-164	-152	-150	-148	-138	-132	-130	-120	-102	-84	-64	-62	-48	-36	-34	0	-18	-16	0	-6	0	0	100	114
263	-538	-522	-520	0	-456	-308	-180	-176	-164	-162	-160	-150	-144	-142	-132	-114	-96	-76	-74	-60	-48	-46	0	-30	-28	0	-18	0	0	88	102
175	-626	-610	-608	-608	-544	-396	-268	-264	-252	-250	-248	-238	-232	-230	-220	-202	-184	-164	-162	-148	-136	-134	-132	-118	-116	-116	-106	-100	-88	0	0
161	-640	-624	-622	-622	-558	-410	-282	-278	-266	-264	-262	-252	-246	-244	-234	-216	-198	-178	-176	-162	-150	-148	-146	-132	-130	-130	-120	-114	-102	0	0

Figure 53 : Utilisation d'une matrice de distance entre m/z pour rechercher des pertes de masses caractéristiques de mono- et oligosaccharides. Par commodité de lecture, les masses sont arrondies à l'unité. Conformément à la règle de l'azote, les pertes de masse recherchées sont paires. Les pertes de masses impaires ont été remplacées par des 0 dans la matrice. Les cases en jaune symbolisent la diagonale de la matrice. Chaque perte de masse est illustrée par une mise en forme différente. Par exemple, -162 perte d'un hexose, -132 la perte d'un pentose, -42 perte d'un acétate, -18 perte de H₂O...

À partir des motifs neutres de pertes de masse et des structures potentielles attribuées à la liste de m/z, il est possible de reconstituer la structure de fragments potentiels, comme illustré à titre d'exemple dans la Figure 54.

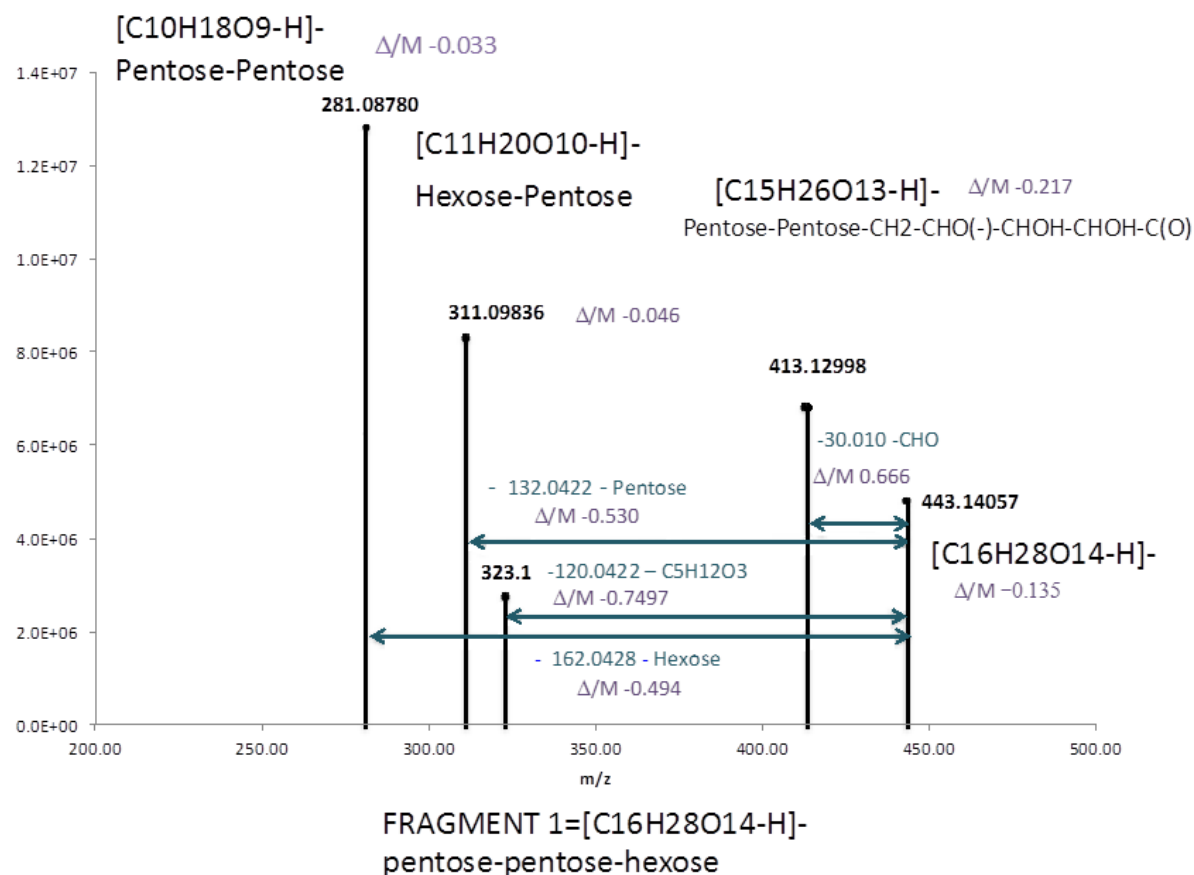


Figure 54: Exemple d'interprétation des m/z et des pertes de masse entre m/z. pour un oligosaccharide de type 'pentose-pentose-hexose" (masse 443.14057). La tolérance entre masse théorique et expérimentale à la fois pour les m/z et les pertes neutres de masse est de $\pm 0,7$ ppm.

Sur le même principe, on génère le Tableau 14 d'interprétation. La tolérance entre la masse expérimentale et la masse théorique pour les m/z est comprise entre -0.13540 et + 0.31047.

Tableau 14 : Attribution de structures potentielles correspondant aux m/z et aux pertes de masse entre signaux. UA symbolise un acide uronique.

m/z		Fragment hypothétique	Formule brute	Masse théorique	Masse Expérimentale	Δ/M
801,12096					801,12096	
785,12610					785,12610	
783,13868					783,13868	
783,06942					783,06942	
719,16705					719,16705	
571,13058					571,13058	
443,14057		[Pentose-Pentose-6-Hexose -H]-. Présence des fragments correspondant aux pertes de masse -18, -30 (CH ₂ O) et -162 (Hexose) caractéristiques enchainement 1,6	[C16H28O14-H]-	443,14063	443,14057	-0,13540
439,10922		[UA-Pentose-Pentose-H ₂ O-H]- [UA-Hexose-Hexose-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-H]-	C16H26O15-H ₂ O-H- C18H30O17-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-H-	439,10933 439,10933	439,10922 439,10922	-0,25051 -0,25051
427,16099					427,16099	
425,12997		[Hexose-1→6-(3,4-DiOAc)-Hexose-H] perte de masse de -102 (60+42), -132 (90+42), -144 (102+42), pertes -18, -30, -60 -90 caractéristiques enchainement 1,6 [Pentose-pentose-hexose-H ₂ O-H]- [UA-6Deoxyhexose-6-deoxyhexose -C ₂ H ₄ O ₂ -H]- [Hexose-Hexose-Hexose -C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-1]-	[C16H26O13-H]- [C16H28O14-H ₂ O-H]- [C18H30O15-C ₂ H ₄ O ₂ -H]- [C18H32O16-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-1]-	425,13006 425,13006 425,13006 425,13006	425,12997 425,12997 425,12997 425,12997	-0,21170 -0,21170 -0,21170 -0,21170
423,11429		Succinyl-Hexose-Hexose-H ₂ O-H]- Succinyl-Hexose-Pentose -C ₂ H ₄ O ₂ -H]-	[C16H26O14-H ₂ O-H]- [C16H30O16-C ₂ H ₄ O ₂ -H]-	423,11441 423,11441	423,11429 423,11429	-0,28361 -0,28361
413,12998		[Pentose-Pentose-Pentose-H]; fragments -18, -90 -102 -132 [Pentose-Pentose-Hexose-C ₂ H ₄ O ₂ -H]; m/z 425-18-H; m/z 443 fragmentation de l'hexose-30 (-CH ₂ O)	[C15H26O13-H]- [C17H30O15-C ₂ H ₄ O ₂ -H]-	413,13006 413,13006	413,12998 413,12998	-0,19364 -0,19364
407,11943		[Hexose-Hexose-Di-OAc -H ₂ O-H]- [Hexose-1→6-(3,4-DiOAc)-Hexose-H ₂ O-H]	[C16H26O13-H ₂ O-H]-	407,11950	407,11943	-0,17194
405,10376		m/z 423 -18				
395,11947		[Tri-pentose-H ₂ O-H]- ; m/z 425 0,2A ; m/z 443 fragmentation de l'hexose-60 (C ₂ H ₄ O ₂) [Pentose-Hexose-Hexose-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-H]- [Succinyl-Hexose-Hexose-OMe-H]- [OMe-6-Deoxyhexose-Hexose-H]-	[C15H26O13-H ₂ O-H]- [C17H28O14-C ₂ H ₄ O ₂ -H]- [C17H28O14-C ₂ H ₄ O ₂ -H]- [C17H28O14-C ₂ H ₄ O ₂ -H]-	395,11950 395,11950 395,11950 395,11950	395,11947 395,11947 395,11947 395,11947	-0,07593 -0,07593 -0,07593 -0,07593
377,10891		[Succinyl-Hexose-Hexose-OMe -C ₂ H ₄ O ₂ -H]- ou [Succinyl-Hexose-OAc-pentose -C ₂ H ₄ O ₂ -H]-	[C17H28O14-C ₂ H ₄ O ₂ -H ₂ O-H]-	377,10891	377,10891	0,00000
359,09840						
339,12966		[OMethyl -6-deoxyhexose-Hexose -H]-	C13H24O10-H]-	339,12967	339,12966	-0,02949
337,07757		m/z 439 -102 (60+42, C ₄ H ₆ O ₃) 0,2A avec acétate en position 2 de l'hexose [UA-Hexose -H ₂ O-H]-	[C12H20O12-H ₂ O-H]-	337,07763	337,07757	-0,17800
323,0984		[Hexose-Hexose-H ₂ O-H]- [OAc-Hexose-Hexose-C ₂ H ₄ O ₂ -H]- m/z 443 fragmentation de l'hexose -120 (C ₅ H ₁₂ O ₃) et m/z 413-90 (C ₃ H ₆ O ₃) [Hexose-Hexose-OAc-OAc-C ₄ H ₆ O ₃ -H] 0,2A	C12H22O11-H ₂ O-H)- [C14H24O12-C ₂ H ₄ O ₂ -H]- [C16H26O13-C ₄ H ₆ O ₃ -H]-	323,09837 323,09837 323,09837	323,09838 323,09838 323,09838	0,03095 0,03095 0,03095
321,11907		[OMethyl-6-deoxyhexose-Hexose -H ₂ O-H]-	C13H24O10-H ₂ O-H)-	321,11911	321,11907	-0,12456
311,09836		[Pentose-Hexose -H]- m/z 443 -pentose m/z 413-60-42	[C11H20O10-H]-	311,09837	311,09836	-0,03214
309,11909		[OMethyl- 6-deoxyhexose-Hexose -CH ₂ O- H]- [6-deoxyhexose-6-deoxyhexose -H]-	C13H24O10-CH ₂ O-H)- C12H22O9 -H)-	309,11911 309,11911	309,11909 309,11909	-0,06470 -0,06470
307,06707		[UA-Pentose -H ₂ O-H]- ; [m/z 439- pentose-H ₂ O-H]-	[C11H18O11-H ₂ O-H]-	307,06707	307,06707	0,00000
293,08778		[Hexose-Pentose -H ₂ O-H]- m/z 425 -Pentose (relié à m/z 443 et m/z 323 -30: m/z 425 (-90-42) [Succinyl- OAc-Hexose- H]-	[C11H20O10 -H ₂ O-H]- [C11H18O9-H]-	293,08781 293,08781	293,08778 293,08778	-0,10236 -0,10236
291,10855		[6-deoxyhexose-6-deoxyhexose -H ₂ O-H]- ou OMethyl-6-deoxyhexose-Hexose-CH ₂ O-H [UA-Deoxypentose-H]- ; m/z 423-Pentose; m/z 407 -deoxypentose	[C12H20O9-H ₂ O-H]- [C11H16O9-H]-	291,10854 291,07216	291,10855 291,07217	0,03435 0,03436
281,08780		[Pentose-Pentose-H]- ; m/z 443-Hexose : m/z 413-pentose: m/z 323-42 (OAc)	[C10H18O9-H]-	281,08781	281,08780	-0,03558
275,07721		[Succinyl-Hexose-OAc -H ₂ O-H]	[C11H18O9-H ₂ O-H]-	275,07724	275,07721	-0,10906
263,07723		[Pentose-Pentose -H ₂ O-H]- ; [m/z 425-Hexose-H]- ; m/z395- pentose : m/z 323-60	[C10H18O9-H ₂ O-H]-	263,07724	263,07723	-0,03801
175,02486		[UA -H ₂ O-H]- ; m/z 439 - Pentose-Pentose; [m/z 337-Hexose-H ₂ O-H]- ; [m/z 423 -Pentose-deoxypentose-H]-	[C6H10O7-H ₂ O-H]	175,02481	175,02486	0,28567
161,04560		[Hexose -H ₂ O-H]- ; [m/z 425-Pentose-Pentose -H]- ; m/z 323 -162	[C6H12O6-H ₂ O-H]-	161,04555	161,04560	0,31047

Tableau 15 : Résumé des structures potentielles et nombre de fragments indicateurs de ces structures :

Occurrence	Nombre de fragments	Motif
9		Pentose-Pentose-Hexose
4		Hexose-DiOAc-Hexose
4		Tri-pentose
4		OMe-6-Deoxyhexose-Hexose
3		UA-Pentose-Pentose
3		UA-Hexose-Hexose
3		Succinyl-Hexose-Hexose-OMe
3		UA-6Deoxyhexose-6-Deoxyhexose
3		Hexose-Hexose-Hexose
2		Succinyl-Hexose-OAc

Les éléments présentés dans le Tableau 15 conduisent à proposer l'unité répétée suivante :

-(UA)-(Tri-Pentose)-(Hexose)-(Hexose-di-OAc)-(Hexose-succ)-(Hexose-OMe)-(6-Désoxyhexose)-(6-Désoxyhexose)->

Cet oligosaccharide contenant 4 hexoses, 3 pentoses, 2 désoxyhexoses, 1 acide uronique, ainsi que 2 acétyles, un O-méthyle et un succinyle, de formule brute **C₆₆H₁₀₀O₅₁** peut être détecté sur le spectre global sous forme d'un fragment ^{0,2}A, (M-C₂H₄O₂-H)⁺, C₆₄H₉₅O₄₀⁺ au m/z 1647.49429, (intensité 2,08 10⁶, masse théorique 1647.49474, Δ/M= -0.27314).

En utilisant les indices donnés par la fragmentation, le spectre de masse semble montrer l'unité répétée suivante :

-(UA)-(Tri-Pentose)-1->6-(Hexose)-1->6-(Hexose-3,4-di-OAc)-(Hexose-succ)-(Hexose-OMe)-(6-Désoxyhexose)-(6-Désoxyhexose)->

En dehors de la liste des m/z sélectionnés par le rapport H/C vs O/C, le spectre montre des m/z très intenses, correspondant à des adduits [M+Cl₃COO]⁻ et [M+HSO₄]⁻, identifiables par des motifs isotopiques très caractéristiques. Les ions de ce type ne se fragmentent pas, et il serait donc intéressant d'aller explorer ces signaux en réalisant un programme pour récupérer les m/z concernés.

3.3.4. Structure de l'EPS par RMN

Différentes séquences RMN ont été réalisées sur le surnageant d'une suspension du polymère après 5 h de sonication dans du D₂O :

- un spectre 1D proton;
- un spectre homonucléaire 2D JRES (Homonuclear J-resolved Spectroscopy), qui est un spectre à résolution J, permettant d'obtenir le déplacement chimique des protons sur un axe, et le couplage proton-proton sur l'autre;
- un spectre 2D HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) qui analyse la corrélation des déplacements chimiques des ¹H et ¹³C par les couplages directs ¹J, et l'hybridation des carbones (CH₃, CH₂ ou CH). Ce spectre se révèle très utile pour repérer

rapidement des éléments de structure, comme illustré dans la Figure 55. L'ensemble des spectres RMN est présenté dans l'Annexe 6.

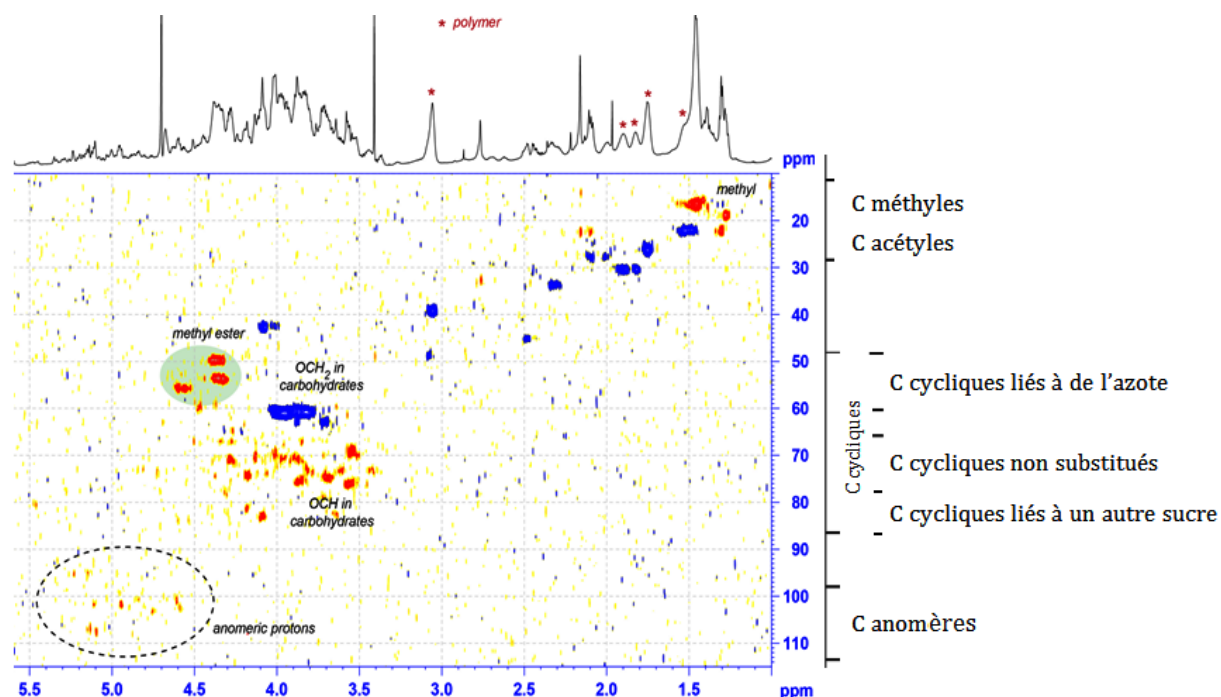


Figure 55: Spectre schématique HSQC montrant les gammes de déplacements chimiques typiques des signaux RMN des protons et des carbones dans les carbohydrates (Lundqvist, 2015).

Les résonances des protons anomères se situent généralement entre 4,2 à 5,8 ppm, avec les protons alpha entre 4,8 et 5,8 ppm et les protons bêta se situant entre 4,2 et 4,8 ppm. Les résonances des carbones anomères sont localisées entre 95 à 110 ppm, avec les signaux des carbones alpha aux alentours de 98 à 103 ppm, et les carbones bêta entre 103 et 106 ppm. Ces éléments, croisés avec les constantes de couplage scalaire $^1J_{C,H}$ et $^3J_{H1,H2}$ peuvent donner des informations sur la configuration du saccharide.

Les protons du cycle saccharide résonnent généralement dans la région 3,2 à 4,5 ppm. Les groupes méthyles des saccharides 6-désoxy et des groupes O- et N-acétyles se trouvent dans la plage de 1,2 à 2,3 ppm. Les signaux des carbones cycliques se trouveront dans la gamme de 50-85 ppm, les carbones liés à de l'azote attaché apparaissant à environ 50-60 ppm, les carbones non substitués dans la gamme 65-75 ppm.

Les carbones impliqués dans la glycosylation présentent un important déplacement vers les bas champs d'environ 5-10 ppm. Les carbones C6 non substitués se trouvent autour de 60-63 ppm et les carbones C6 liés à un autre résidu de saccharide apparaîtront autour de 65-70 ppm. Les signaux carbonés des groupes méthyles se situent dans la plage de 15 à 30 ppm, et les carbones carbonyles se situent entre 165 et 185 ppm (Lundqvist 2015).

Différentes séquences 2D- ^1H - ^1H , COSY (CORrelation Spectroscopy) et TOCSY (TOtal Correlated Spectroscopy) permettent d'individualiser les systèmes de spin couplés et de mesurer les constantes de couplage $^3J_{\text{H,H}}$, entre protons. L'ordre de grandeur de cette constante de couplage renseigne sur la stéréochimie des protons ($^3J_{\text{Haxial, Héquatorial}} = 2-5$ Hz, $^3J_{\text{Haxial, Haxial}} = 7-12$ Hz, $^3J_{\text{Héquatorial, Héquatorial}} = 2-5$ Hz) et permet de déterminer la nature de la configuration, gluco-, manno- ou galacto-.

L'interprétation des spectres RMN consiste à recouper les informations provenant des différentes analyses, comme le déplacement chimique (^1H et ^{13}C), les figures de couplage (singulet, triplet, multiplet...), l'intégration du signal ^1H (nombre de protons), l'homo- (^1H - ^1H) et hétéro- (^1H - ^{13}C) corrélation des signaux, et les constantes de couplage (1J, 3J), à les interpréter et à les comparer à la littérature, pour proposer la structure de motifs présents dans le polymère.

Seuls quelques pics transversaux ont été obtenus dans les spectres JRES et COSY. Le comportement de relaxation observé pour les protons est caractéristique de celui d'une macromolécule.

Les spectres TOCSY ont produit de nombreux pics de corrélation (Annexe 6). Toutefois, la comparaison entre deux expériences avec des temps de mélange TOCSY de 70 msec et 10 msec indique également une forte relaxation différentielle, ce qui confirme la présence d'un polymère. L'allure générale des spectres est complexe : on compte 45 protons anomères dans la séquence TOCSY et 11 types de carbones anomères dans le spectre HSQC. L'étape de sonication a probablement généré de nombreux fragments hétérogènes. Cette hétérogénéité conduit à des chevauchements de signaux et complique l'étude RMN.

Comme il n'a pas été possible de générer les spectres COSY, les constantes de couplage ont été mesurées sur les spectres TOCSY, ce qui est moins aisé.

L'absence de spectre 1D- ^{13}C , ne permet pas d'exclure des carbones anomériques provenant de kétooses et d'acides ulosoniques (*e.g.* Kdo). Nous n'avons pas non plus de séquence NOESY ou HMBC permettant de repérer l'enchaînement et l'assemblage des unités identifiées dans le spectre. Compte tenu de la complexité des spectres, certains résultats décrits dans cette section restent donc sujets à réserves et devront être confirmés.

Le spectre ^1H -1D indique la présence de plusieurs éléments de structure, caractéristiques de polysaccharides dans des gammes de déplacements chimiques spécifiques :

A) De 1,2 à 2,3 ppm :

Dans la gamme de déplacements chimiques proton 1,2 à 2,3 ppm, on repère de multiples signaux sous formes de doublets ou multiplets très fins, caractéristiques d'un méthyle couplé à un proton. Ces résonnances sont corrélées à des signaux ^{13}C de type CH_3 sur le spectre HSQC et à des résonnances très complexes de protons dans le spectre ^1H - ^1H TOCSY :

1,28; 1,30; 1,31; 1,38; 1,39; 1,45; 1,47; 1,5

1,27/19 ppm (CH_3) couplé à des signaux à 4,28 ppm ; 4,35 ppm; 4,45 et 4,48 ppm

1,29 /19 ppm (CH_3) couplé à 4,28 ppm ($J_{\text{H6,H5}}$ 8 Hz); 4,35 et 4,44 ppm

1,30-1,31/22 ppm (CH₃) (3J ~ 8 Hz) couplé à 2,47, 4,28 ppm

1,32/22 ppm (signal peu intense) (CH₃) (3J ~ 8 Hz) 2,48 ppm

1,38/17,2 ppm couplé à 3,52 ppm, 3,76 ppm

1,42/15,8 ppm (CH₃) couplé à 4,68 ppm (J~8 Hz)

1,46/16,5 ppm (CH₃) (3J~8Hz) couplé à 4,38 ppm

Les valeurs soulignées correspondent aux déplacements chimiques de protons d'un cycle saccharidique (3,2 à 4,5 ppm). Les valeurs en gras indiquent des déplacements chimiques distinctifs du méthyle de 6-désoxysaccharides (Lundqvist 2015).

Le déplacement chimique du méthyle d'un 6-désoxy-rhamnose est très sensible à son environnement. Le méthyle (C/H) résonne par exemple à 1,34-1,32/17,7-17,9 dans le cas d'un 4)-α-L-Rhap-(1-> (Ravenscroft et al., 2015) et à 1,28/19,2 ppm (Glushka *et al.*, 2003) dans le cas d'un autre 4)-α-L-Rhap-(1->. Les déplacements chimiques carbone et protons indiquent que les deux signaux 1,27 et 1,29 (19 ppm) pourraient provenir du méthyle d'un ->2-α-Rhap-1->, (1,28/19,2 ppm (Glushka *et al.*, 2003).

Le signal déblindé du CH₃ à 1,38/17.2 ppm proviendrait de la liaison d'un α-rhamnose à un acide uronique (Glushka *et al.*, 2003, *AceA-3-Rha-1*, 1,31/17,5) (Lahaye and Ray, 1996, *GlcA-3-α-Rha-1*, 1,34/17,9 ppm).

Le signal proton déblindé et le signal blindé du carbone du méthyle à 1,42/15,8 ppm peuvent indiquer la présence voisine d'un hétéroatome de type azote. Le déplacement chimique du doublet à 1,46 ppm pourrait être le signal d'un CH₃ groupe pyruvate, mais le déplacement chimique du ¹³C serait alors aux environs de 25,7 ppm (Garegg *et al.*, 1980). Les signaux résonnant à 1,28; 1,30; 1,32; 1,41; 1,46 et 1,48 ppm pourraient correspondre aux CH₃ d'acides aminés tels que Thr, Arg, Pro..

Au-delà de 2 ppm, on observe :

- un multiplet complexe à 2,05 ppm et un massif large à 1,94 ppm (respectivement, CH₂ 27,5 ppm et CH₂ 28 ppm). Les deux signaux sont couplés (3J ~7Hz) caractéristique d'un succinyle, substituant un saccharide via une liaison ester (van del Bulke, 1991 ; Orgambide *et al.*, 1996);
- un singulet à 2,10 ppm (CH₃, 22,4 ppm) et un singulet intense à 2,17 ppm (CH₃, 22,4), correspondant à des CH₃ de type acétate ou amide. Cette assignation est corroborée par la présence d'un doublet (J ~8Hz) à 5,60 ppm (CH, 92,5 ppm) caractéristique du signal d'un proton présent sur le carbone d'un cycle glycosidique O-acyle (Orgambide *et al.*, 1996 ; Haverkamp *et al.*, 1982). Le déplacement chimique très déblindé exclut que ce groupement O-acétyle soit porté par le carbone C6 d'un résidu hexose. De plus la constante de couplage de 8Hz traduit le couplage axial-axial de ces protons;
- un singulet à 2,76 ppm Me (CH 33 ppm), potentiellement le H₂ d'un glucosamine;
- un singulet 3,40 ppm (CH₃ 49 ppm) correspondant à un substituant méthoxyle (OMe) sur un cycle glycosidique (Orgambide *et al.*, 1996). Par exemple, un 3-O-Me sur un galactose résonne à 3,46 ppm (He *et al.*, 2015), et 3,45 et 3,42 pour un 2-OMe et 3-OMe sur un 6-désoxyhexose (Ogawa *et al.*, 1997)

Plusieurs signaux, corrélés d'après le spectre ¹H, ¹H TOCSY NMR, à 1,55 (CH₂, 22 ppm), 1,75 (CH₂, 26 ppm), 1,85 et 1,93 (CH₂, 30,5 ppm), 3,06 (CH₂, 39 ppm), et 4,37 (CH,

50 ppm) indiquent qu'une lysine est engagée dans une liaison amide. Le H du NH est localisé à 7,05 ppm. (Reisdorf *et al.*, 1994). La présence d'acide aminé, de type lysine, est par exemple retrouvée liée à un acide galacturonique dans la partie O-polysaccharide du LPS de *Proteus mirabilis* (Gromska and Mayer, 1975 ; Shashkov *et al.*, 1996).

Spectre HSQC :

Le spectre ^1H , ^{13}C DEPT-HSQC (corrélacion quantique simple hétéro-nucléaire) révèle le couplage de carbone-proton à travers une liaison simple. Les pics contiennent des informations sur les déplacements chimiques des protons et des carbones correspondants. Le nombre de monosaccharides peut être plus facilement déterminé dans un spectre HSQC que dans un spectre ^1H , en raison de la dispersion des déplacements chimiques dans la dimension carbone. La séquence HSQC permet de distinguer les groupes CH/CH₃ qui donnent des signaux positifs (en rouge), et les groupes CH₂ qui donnent des signaux (en bleu) (Fig. 55). Les carbones quaternaires, dépourvus de protons directement liés, ne seront pas visibles dans cette expérience (Lundqvist, 2015).

La présence de signaux de résonnance entre 50 et 60 ppm (4,33/54 ; 4,52/55,5 ppm ; 4,50/56 ; 4,36/58,5 ; 4,48/59) dans le spectre HSQC montre qu'il peut y avoir des C liés à de l'azote.

Plusieurs signaux résonnent entre 80 et 85 ppm (4,18/81; 4,1/82,5 et 83; 4,08/82,5 ; 3,63/82 et 3,66/82) et indiquent la présence de C cycliques de type furanose (Gorin *et al.*, 1981 ; Neszmllyi *et al.*, 1985). Les C1 de ces furanoses sont situés à 5,13/107 ppm (noté J), 5,15/107 ppm (noté I) et 5,098/107.5 (noté K) (Fig. 56). Tous les autres signaux dans la gamme de déplacements chimiques des CH cycliques correspondent à des pyranoses.

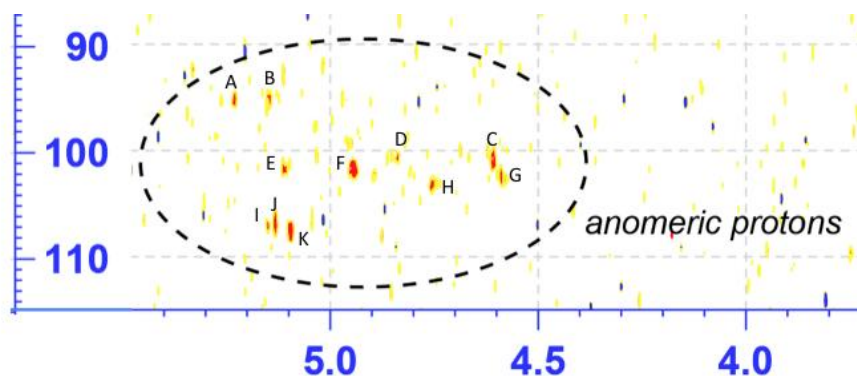


Figure 56 : Zoom sur la zone des protons anomères.

B) Zone des protons anomériques :

Dans la zone des signaux H et C anomériques (4,2 à 5,8 ppm et 90-100 ppm), on identifie 11 types de carbones anomériques, notés de A à K (Fig. 56), du déplacement le plus déblindé au moins déblindé. Les déplacements chimiques des protons et carbones corrélés, ainsi que les constantes de couplage 3J, sont résumés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Déplacements chimiques (d) des protons et carbones anomériques d'après la séquence HSQC.

Signal	d proton (ppm)	d carbone (ppm)
A	5,23	95
B	5,14	95
C	4,61	101
D	4,84	101
E	5,11	102
F	4,94	102
G	4,59	102,5
H	4,65	104,2
I	5,15	107
J	5,13	107
K	5,09	107,5

Le regroupement des informations dans les différents spectres amène à proposer les attributions suivantes. Les déplacements chimiques soulignés sont des résonnances déblindées traduisant le greffage d'un monosaccharide ou une substitution.

Résonnance H/C J : H1 5,13/107 ppm ($J_{H1,H2} < 2$ Hz); **H2** 4,18/81 ($J_{H2,H3} 16$ Hz); H3 4,28/71 ($J_{H3,H4} 12$ Hz) ; H4 4,08/82,5 ($J_{H4,H5} 10$ Hz) ; H5 3,88, H5 3,705 /62,5 ppm -2- β -Ribofuranosyl-1-> (corrélation H1-H5 identifiée à partir de TOCSY, HSQC et Neszmélyi *et al.*, 1985)

J= ->2)- β -Ribp-(1->

Résonnance H/C I : H1 5,15/107 ($J_{H1,H2} 8$ Hz); H2 3,84/75 ($J_{H2,H3} 15$ Hz); H3 3,56/76 ($J_{H3,H4} 7,2$ Hz); **H4** 4,10/82,5 ($J_{H4,H5} 8$ Hz); H5 3,58, H5 3,64/62 β -Ribofuranosyl-1-> (identifié à partir de TOCSY, HSQC et Neszmélyi *et al.*, 1985).

I= Motif β -Ribp-(1->

Résonnance H/C K : 5,09/107,5 ; **H2** 4,19/81 ($J_{H1,H2} 10$ Hz) ; H3 4,27/71($J_{H2,H3} 8$ Hz) ; H4 4,1/83 ($J_{H3,H4} 10$ Hz) ; **H5** 3,63 et 3,66 ($J_{H4,H5} 12$ Hz) 82 ppm

K=>5)- β -Ribp-(1->.>



La compilation de ces données de RMN donne un motif de type ->5-(β -Ribp-2- β -Ribp)-1->2- β -Ribp-1-> qui confirme les données de FTICR-MS sur la présence d'un tri-pentose.

Résonnance H/C A : l'ose correspondant au H/C anomère A présente les déplacements chimiques et les constantes de couplage résumées dans le Tableau 17.

Tableau 17: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide A

Proton A	δ ppm	$^3J_{H,H}$	(Hz)	δ ppm
H1	5,23			95,5
H2	4,32	$J_{H1,H2}$	<5	<u>78</u>
H3	4,015	$J_{H2,H3}$	>5	69,5
H4	3,575	$J_{H3,H4}$	>5	<u>76</u> (ou 69)
H5	3,83	$J_{H4,H5}$	>5	72 (ou 75)
H6	3,89			61
H6	4,01			61

La constante de couplage $^3J_{H1,H2}$ est inférieure à 5 Hz tandis que les constantes de couplage $^3J_{H2,H3}$, $^3J_{H3,H4}$ et $^3J_{H4,H5}$ sont supérieures à 5 Hz, ce qui évoque un α -Glc_p. Le déplacement chimique du C1 (95 ppm) et le déblindage du C2 (78 ppm) et du C4 (76) conduisent à proposer un motif **-2,4)- α -Glc_p-(1->** pour le proton A.

Résonnance H/C B

Le proton B à 5,15/95 ppm est corrélé à H2 4,185/(74 ou 81 ppm) (3J <5) et 4,29/71 ppm (Tableau 18). Pour les mêmes raisons que celles citées ci-dessus, le proton B présente une configuration galacto. Le déplacement chimique du H2 est potentiellement déblindé avec possibilité d'une substitution par un OMe en position 2.

Tableau 18: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide B. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé.

Proton B	δ ppm	$^3J_{H,H}$	(Hz)	δ ppm
H1	5,14			95
H2	4,185	$J_{H1,H2}$	~3,2	<u>81</u> (ou 74)
H3	4,029	$J_{H2,H3}$	>5	71
H4	4,09	$J_{H3,H4}$	~12	<u>83</u>
H5	3,885	$J_{H4,H5}$	~10	71 (ou 76)
H6	3,69			63
H6	3,72			63

Les constantes de couplage et le déplacement chimique déblindé des protons H1 et H4 suggèrent un **->4)- α -Gal_p-2-OMe-(1->**

Résonnance H/C C :

Le proton H1 C présente une configuration gluco-, tous les H du cycle présentent un pic de corrélation avec H1 et les constantes de couplages 3J sont supérieures à 5 Hz. Les déplacements chimiques du proton et carbone 1 (4,61/101) évoquent un β -Glc_p (Tableau 19).

Tableau 19: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide C. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé.

Proton C	δ ppm	$^3J_{H,H}$	(Hz)	δ ppm
H1	4,61			101
H2	3,84	$J_{H1,H2}$	>5	72 (ou 75)
H3	4,08	$J_{H2,H3}$	>5	83
H4	4,11	$J_{H3,H4}$	>5	83
H5	4,14	$J_{H4,H5}$	>5	71
H6	3,94			63 ou 71
H6	3,97			63 ou 71

Le déplacement chimique du CH₂ en position 6 est potentiellement déblindé (71 ppm), ce qui suggère un enchaînement 6)- β -Glc_p-1->. Le déblindage des carbones C3 et C4 (83 ppm) pourrait correspondre à une substitution des positions 3 et 4 par des OAc. Le glycoside C pourrait être un **6)-3,4-Di-OAc- β -Glc_p-(1->**, confirmant l'hypothèse émise en spectrométrie de masse d'un monosaccharide di-O-acétylé en 3,4 et lié en position 6.

Résonnances H/C E, F et G

Les résonnances H/C du proton E sont les suivantes (Tableau 20) :

Tableau 20: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide E. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé.

Proton E	δ ppm	$^3J_{H,H}$	(Hz)	δ ppm
H1	5,108			102
H2	3,86	$J_{H1,H2}$	<5	71 (ou 66)
H3	4,18	$J_{H2,H3}$	>5	74
H4	4,28	$J_{H3,H4}$	>5	71
H5	4,35	$J_{H4,H5}$	>5	67
H6	1,3			22

Le proton E pourrait être un **3)-Rhap-(1->**.

Les protons F (4,94/102) et G (4,59/102.5) sont en cours d'interprétation.

Résonnance H/C H

Sur la base du proton indexé H à 4,62 ppm, la corrélation des protons de H1 à H5, l'absence de résonnance C6 et le déblindage des carbones C4 et C5, suggèrent un motif beta-Glucuronique acide lié en 1 et 4 (Tableau 21)

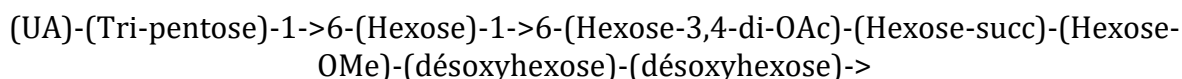
Tableau 21: Déplacements chimiques des protons et carbones liés au monosaccharide H. Les valeurs en gras indiquent que les protons sont corrélés avec H1. Les valeurs soulignées signalent un déplacement chimique déblindé.

Proton H	δ ppm	$^3J_{H,H}$	(Hz)	δ ppm
H1	4,62			104,2
H2	3,98	$J_{H1,H2}$		71
H3	3,94	$J_{H2,H3}$		71
H4	3,64	$J_{H3,H4}$		74
H5	3,44	$J_{H4,H5}$		74
H6				

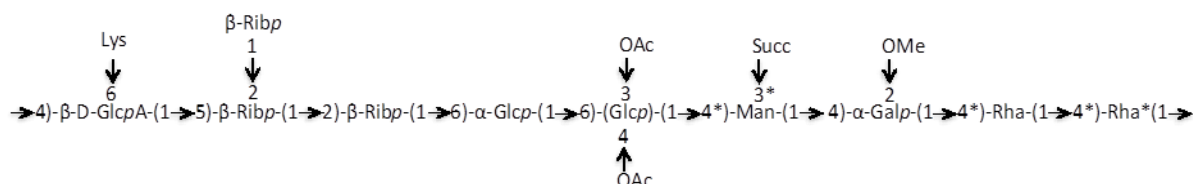
Ce monosaccharide pourrait être le motif lié à l'acide aminé lysine, précédemment identifié en spectrométrie de masse. Les déplacements chimiques du GlcA sont proches de ceux du motifs $\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-6Lys-(1}\rightarrow$ identifié par Shashkov *et al.* (1996) dans le LPS de *Proteus mirabilis*. Sur la base de ces indices, nous pouvons proposer l'identification suivante : **$\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-6Lys-(1}\rightarrow$**

Conclusions :

Le spectre de masse suggérait un oligosaccharide ayant la structure suivante :



L'analyse RMN confirme la présence des substituants OAc, OMe et la présence de succinate, la présence de deux désoxyhexoses (rhamnos), d'un acide uronique lié à un acide aminé : $\rightarrow 4\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-6Lys-(1}$. Avec toutes les précautions relatives à l'absence de certaines analyses, mentionnées précédemment, nous proposons la structure suivante:



Ce composé possède une masse molaire de formule brute **C72H112O52N2**.

Dans le spectre de masse FTICR-MS, différents ions correspondants à ce composé peuvent être identifiés :

	Formule brute	Masse théorique	Masse exp	Intensité	D/M
[M-H2O-H]-	C72H109O51N2-	1817.60027	1817.59880	1.83E+06	-0.05445
[M+HSO4]-	C72H116O56N2S1-	1936.60169	1936.60369	1.21E+06	-0.14487
[M+CCl3COO]-	C72H112O54N2Cl3-	1973.51505	1973.51290	1.76E+06	0.77992
[M-C2H4O2-H]-	C70H107O50N2-	1775.58971	1775.58966	1.67E+06	-0.27314

3.3.5. Analyse FTIR

Les analyses en spectrométrie de masse fournissent une liste d'hexoses et de pentoses pouvant être substitués par deux acétates, un méthyle et un succinate. Un moyen de mettre en évidence la présence des substituants dans l'EPS de Rta est de faire un spectre FTIR (InfraRouge à Transformée de Fourier) et d'analyser plus particulièrement la région comprise entre 1500-400 cm^{-1} pour l'identification de certains groupements ou liaisons.

Le spectre FTIR d'un échantillon d'EPS de Rta issu d'une culture obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1) et extrait selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1 (Chapitre 2, Fig. 42) est présenté dans Fig. 57. Tout d'abord nous commençons l'interprétation de ce spectre par l'observation des bandes spécifiques pour les monosaccharides. Ainsi le large pic à 3342,03 cm^{-1} correspond aux groupes hydroxyles (-OH) des monosaccharides ou à l'eau lié à la molécule. Le pic à 2927,41 cm^{-1} indique des vibrations d'élongation de type C-H (Sun *et al.*, 2009; He *et al.*, 2014; Mitry *et al.*, 2000), mais peut également cacher des groupes méthyles (Ismail et Madhayan, 2010; Bramhachari *et al.*, 2007). Les deux pics intenses à 1025,94 cm^{-1} et 1066,44 cm^{-1} correspondent aux liaisons C-O-C et C-O. Ils sont typiques des monosaccharides et confirment donc que le polymère est un polysaccharide (Bremer et Geesey, 1991; Yan *et al.*, 2003; Patil *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2009). Il n'est pas exclu que le pic à 833,1 cm^{-1} corresponde à une vibration caractéristique de la liaison équatoriale C-H dans la α -D-glucopyranose (Yang *et al.*, 2015 ; Yang et Zhang, 2009 ; Su *et al.*, 2013 ; Lin *et al.*, 2012).

La présence des lipides n'est pas exclue vu que le pic à 1751,04785 cm^{-1} indique des liaisons esters (C=OOR) (Guidi *et al.*, 2012). Pourtant le pic à 2927,41 cm^{-1} typique pour les liaisons C-H n'est pas très important et donc la quantité de lipides présents doit être faible. Nous pouvons exclure également la présence des protéines qui apparaissent en forme de deux pics, un à 1650 cm^{-1} appelé "Amide I" pour les vibrations d'élongation de C=O lié au hydrogène et un à environ 1550 cm^{-1} appelé "Amide II" pour les vibrations d'élongation de C-N et de CNH (Guidi *et al.*, 2012). Dans notre cas le deuxième pic à 1550 cm^{-1} n'est pas présent. Et donc, probablement cela indique également une absence des groupes amines.

Nous retrouvons aussi des pics qui sont certainement lié à la présence de TCA. Ainsi les deux pics à 1677,77 cm^{-1} et 1236,15 cm^{-1} sont particulier pour les groupes carboxyliques (Song *et al.*, 2013 ; Yan *et al.*, 2003 ; Ismail et Madhayan, 2010 ; Patil *et al.*, 2010). De plus les deux pics à 1236,15 cm^{-1} et 1025,95 cm^{-1} indiquent des fortes liaisons C=O qui sont attribué aux élongations symétriques et asymétriques des vibrations du groupe carboxylique (Song *et al.*, 2013). Selon Kazy *et al.* (2002) le pic à 1236,15 cm^{-1} peut également être un signe d'ester *o*-acétyl, confirmant la présence des groupements OAc dans la structure d'EPS qui a été suggérée également par les analyses RMN et FTICR-MS. Les pics intenses détectés de groupes carboxyliques proviennent d'une partie de l'acide glucuronique présente dans la structure d'EPS confirmant les résultats des analyses RMN et FTICR-MS mais sont sûrement en grande partie à l'origine de TCA étant donné que sa quantité se relève à environ 50 % dans les échantillons d'EPS (cf. paragraphe 3.3.1, Chapitre 2). Dans ce cas particulier, le pic à 676,89 cm^{-1} peut correspondre aux vibrations d'élongation de C-Cl et celui de 833,1 cm^{-1} au trichlorométhyl, tous les deux issus du TCA (Arve *et al.*, 2006 ; Socrates, 1994).

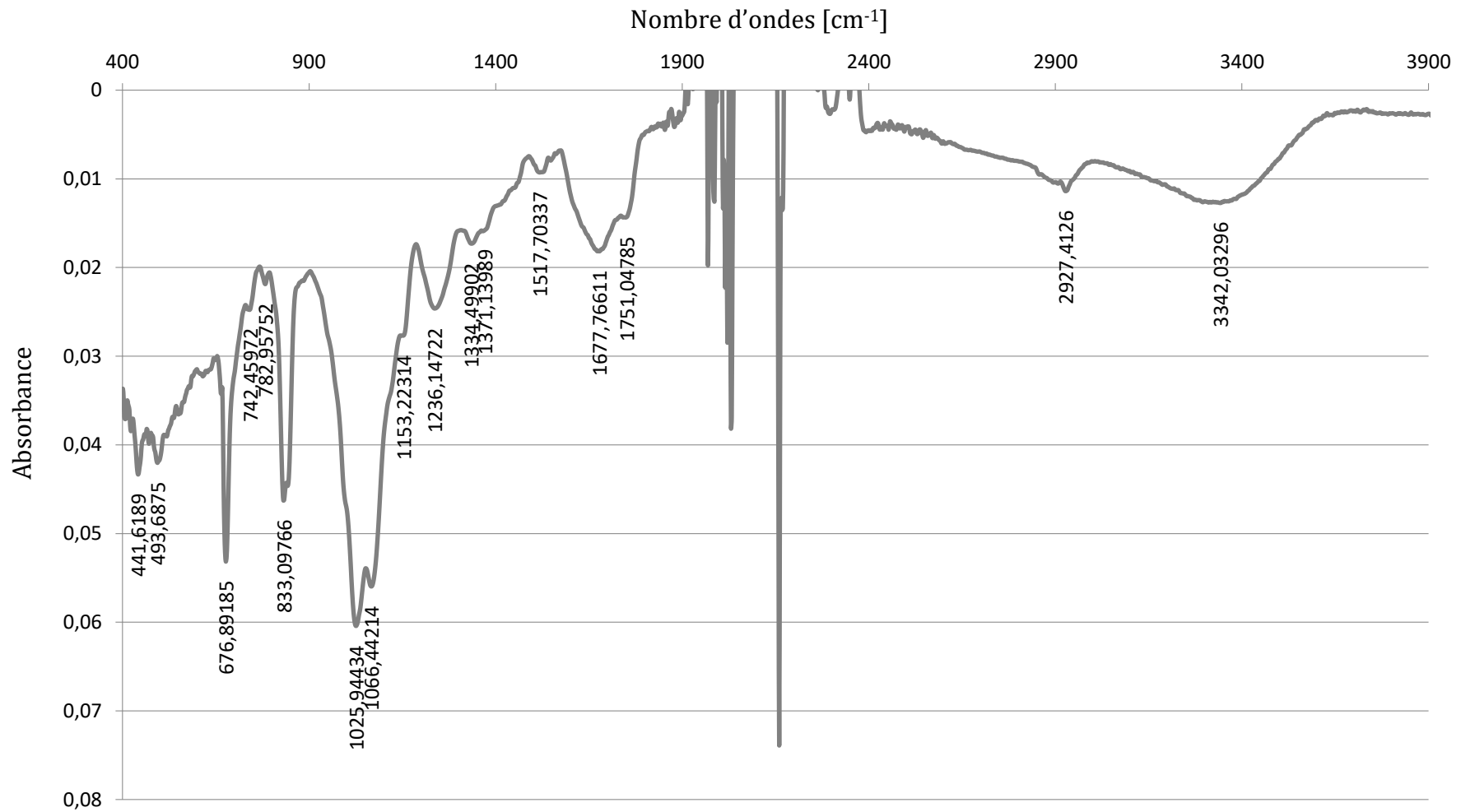


Figure 57: Spectre proche infrarouge (FTIR) de l'EPS de Rta issu d'extraction, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir d'une culture obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1).

En conclusion de cette partie consacrée à l'analyse FTIR nous retrouvons dans l'EPS de Rta essentiellement des monosaccharides avec la présence possible d'une faible quantité de lipides. Le polysaccharide ne semble pas contenir de protéines en l'absence de groupements amines et amides détectés. Par contre la présence des substituants de type **méthyle, acétyle et acide uronique** dans la structure d'EPS est confirmée. On retrouve des traces de la contamination avec de TCA pouvant compliquer l'analyse de l'EPS et confirmant la nécessité de le purifier davantage.

3.4. Optimisation de la purification de l'EPS

Pour améliorer les analyses structurales de l'EPS de Rta, nous avons décidé d'optimiser l'étape de purification. Notre tout premier objectif est d'éliminer le TCA qui représente la contamination la plus importante des échantillons d'EPS. Ensuite il serait également important de se débarrasser des lipides.

3.4.1. Moyens de purification

Pour purifier l'EPS en utilisant du TCA nous avons deux possibilités. La première est d'essayer de purifier les échantillons d'EPS selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir des cultures obtenues en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1). La solution alternative est de modifier ou de changer entièrement le protocole d'extraction. Finalement nous avons décidé de tester les deux possibilités et de comparer la pureté des échantillons obtenus.

3.4.1.1. Purification des échantillons d'EPS de Rta

Si nous utilisons les échantillons de l'EPS, selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.1. (Chapitre 2), le TCA pourrait être éliminé par une simple dialyse. Pour réaliser cette dialyse il faut d'abord solubiliser les échantillons. Le seul moyen que nous connaissons de dissolution de cet EPS est d'utiliser du DMSO. La solution obtenue a été dialysée par la suite.

En fait si nous rajoutons simplement une étape de dialyse à la fin du protocole décrit dans le paragraphe 3.1. (Chapitre 2), les échantillons obtenus ne sont pas assez purs. Nous avons détecté cela grâce à une analyse par FTICR-MS, sans prétraitement d'EPS et sans passage par colonne C18. À partir de cette analyse par spectrométrie de masse, nous avons retrouvé du chlore pouvant interférer avec les résultats, même s'il est en moindre quantité par rapport aux échantillons non dialysés. Nous pensons que la solubilisation de l'EPS dans le DMSO peut permettre de rendre la dialyse plus efficace.

Une autre stratégie de purification de l'EPS consiste à modifier le protocole d'extraction. En effet, il est préférable de ne pas changer complètement le principe d'extraction et de garder la séparation de l'EPS des cellules bactériennes avec du TCA, puisque cette méthode s'est révélée efficace. La première étape que nous avons décidé d'ajouter a été de neutraliser le pH de la solution filtrée PBS-TCA contenant l'EPS séparé de ses cellules (Fig. 58). De cette manière, le chlore du TCA est transformé en sel qui peut être plus facilement éliminé par la suite au cours d'une dialyse. Il est intéressant d'observer que, dans ce cas, après la précipitation à l'éthanol, l'EPS change de conformation et décante comme sous forme agrégée blanche.

Concernant la faible contamination avec des lipides il est possible de l'éviter par plusieurs lavages, centrifugations et remises en suspension de l'EPS dans de l'éthanol augmentant progressivement sa concentration jusqu'à l'utilisation de l'éthanol absolu. Finalement l'ajout d'une étape de dialyse dans le protocole permet l'élimination des sels et des impuretés de faible masse moléculaire.

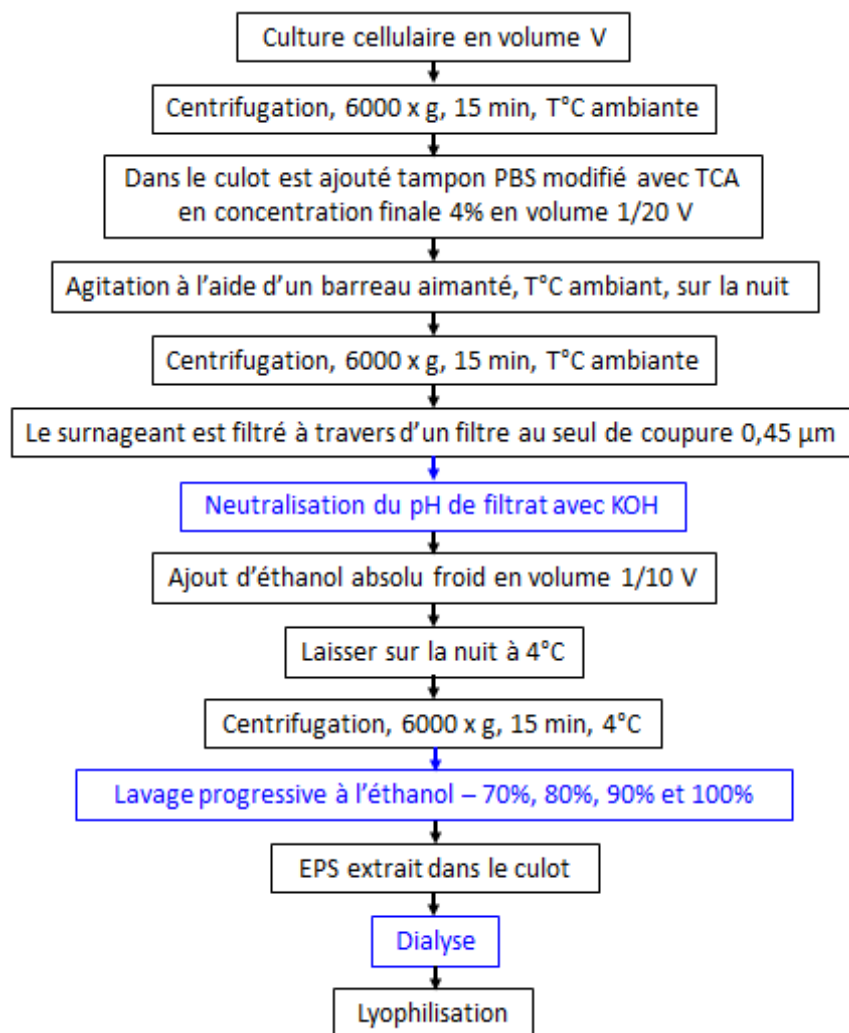


Figure 58: Modification du protocole d'extraction de l'EPS de *Rta* pour obtenir des échantillons purifiés. Les étapes rajoutées par rapport au premier protocole utilisé sont indiquées en bleu.

Grâce à ce nouveau protocole d'extraction, nous avons obtenu un échantillon d'EPS, issu de cultures produites dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1) de cinq Erlenmeyers à l'échelle de 500 mL, où le pH était régulé une seule fois pendant le batch au bout de trois jours. Les mouts bactériens de tous les erlenmeyers ont été récoltés et poolés pour extraire finalement un seul échantillon d'EPS.

3.4.2. Validation de la pureté

Une fois que nous avons obtenu les échantillons théoriquement purifiés, nous avons voulu valider l'absence de TCA et de lipides. Les méthodes les plus pertinentes retenues

pour atteindre cet objectif ont été un dosage colorimétrique des monosaccharides totaux, une analyse élémentaire et un spectre FTIR.

3.4.2.1. Analyse élémentaire et analyse colorimétrique des sucres totaux

L'analyse colorimétrique des monosaccharides totaux selon la méthode de Dubois (1956) met en évidence 42 % en moyenne de monosaccharides réducteurs pour l'échantillon d'EPS purifié par une resuspension en présence de DMSO, suivie d'une dialyse, et 33 % en moyenne pour l'échantillon d'EPS extraits selon le protocole modifié (Fig. 59). Ces résultats ne sont pas meilleurs que celui obtenu selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir des cultures obtenues en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1) qui était de 42 % en moyenne de monosaccharides réducteurs.

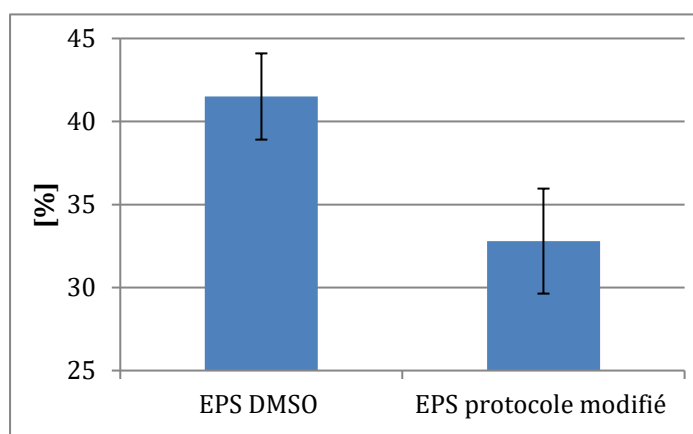


Figure 59: Taux de monosaccharides réducteurs dans les échantillons d'EPS purifiés. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

L'analyse élémentaire CHO, de l'échantillon d'EPS extrait selon le protocole modifié est de 41 % de C et 6 de H % (Fig. 59). Pour les échantillons d'EPS purifié par une resuspension en DMSO suivi d'une dialyse, ces pourcentages sont respectivement de 38 % et 5 %. Ces valeurs sont très proches de celles mesurées sur les échantillons d'EPS obtenus avec le protocole précédent (avant amélioration et/ou sans DMSO). Il est intéressant de noter que dans les échantillons obtenus avec ces deux nouveaux protocoles, nous n'avons pas retrouvé d'azote (DMSO+dialyse), ou alors en très faible pourcentage (protocole modifié, Fig. 60), semblant confirmer l'absence d'azote dans l'EPS. Les traces d'azote mises en évidence dans les premiers échantillons analysés étaient très probablement des contaminations (par exemple membranaires).

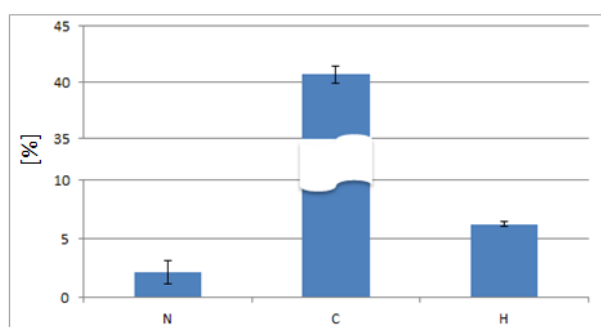


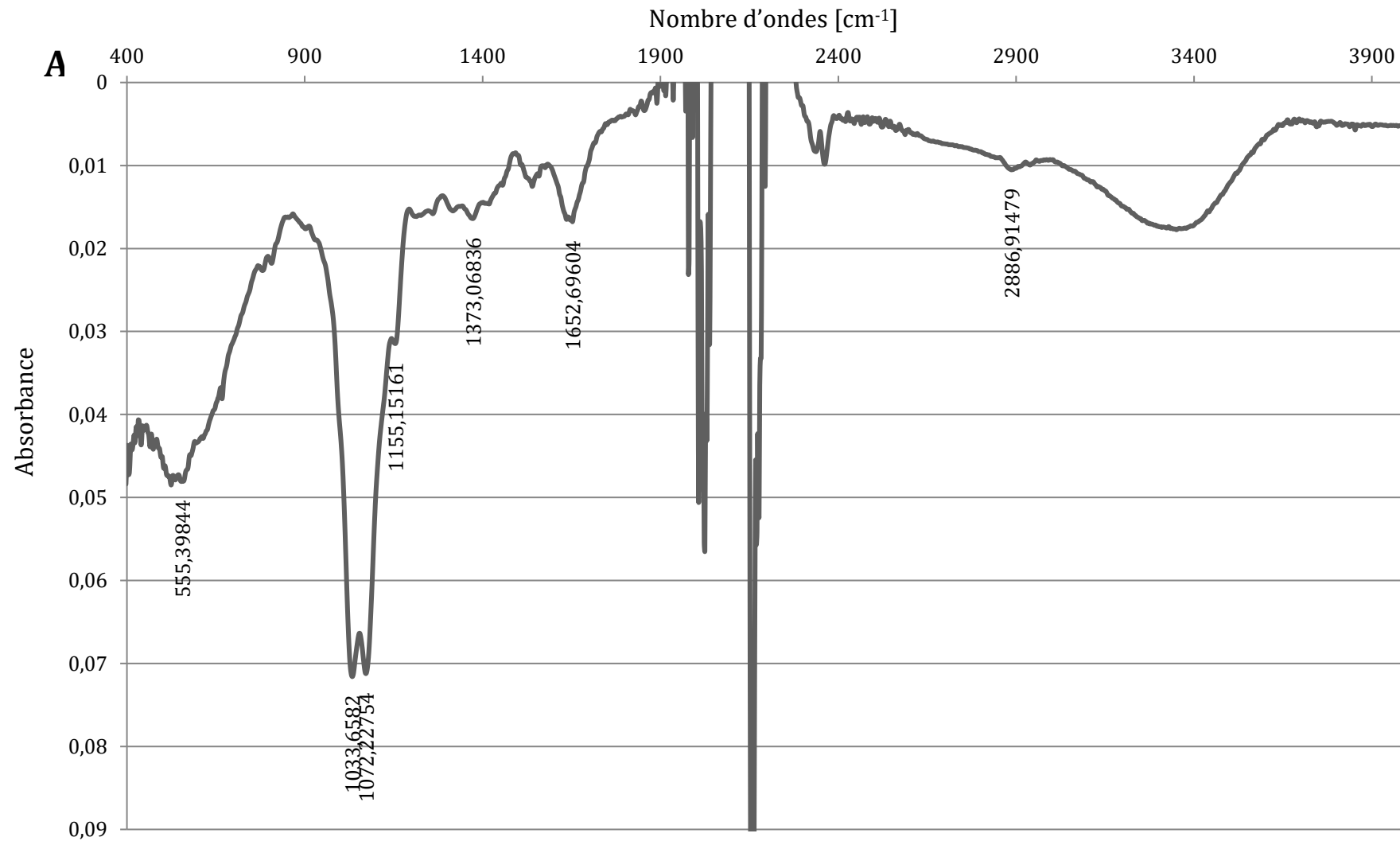
Figure 60: Composition élémentaire, analysé en triplicats pour C, H et N, de l'EPS de Rta, extrait selon le protocole modifié (Fig. 53). Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Selon l'ensemble de ces résultats il peut être considéré que les échantillons d'EPS de Rta provenant d'une purification par une resuspension en DMSO et une dialyse, ainsi que l'échantillon extrait selon le protocole modifié, sont purs et ne contiennent plus ou très peu de TCA. L'analyse colorimétrique de monosaccharides totaux est probablement erronée vu que pour sa réalisation une hydrolyse à l'acide sulfurique de l'EPS est demandée. Nous maîtrisons mal cette hydrolyse d'après les premières analyses en CPG, où nous avons prétraité les échantillons avec H₂SO₄ et nous avons obtenu de faibles quantités en monosaccharides(c.f. paragraphe 3.3.2.1, Chapitre 2).

3.4.2.2. FTIR

Le spectre FTIR de l'échantillon de Rta du protocole d'extraction non modifié et en l'absence de DMSO indiquait clairement la présence de TCA et la possible présence de lipides. Le spectre FTIR de l'échantillon d'EPS purifié par une resuspension en DMSO, puis une dialyse et de l'échantillon d'EPS extrait selon le protocole modifié, montre une très nette diminution des pics provenant de TCA voire une disparition. Donc, la quantité de TCA est certainement diminuée ou éliminée dans les échantillons. Ainsi chez les deux types d'échantillons nous observons une disparition du pic à 1236 cm⁻¹ (Fig. 61A et B), typique pour les groupements carboxyliques (Kazy *et al.*, 2002). Certains autres pics disparaissent également comme celui à 676,89 cm⁻¹ correspondant aux vibrations d'élongation de C-Cl et celui à 833,1 cm⁻¹ provenant de trichlorométhyl (Arve *et al.*, 2006 ; Socrates, 1994).

Nous confirmons également l'absence de lipides dans les deux échantillons vu que le pic à 1751,04785 cm⁻¹, indiquant des liaisons esters (C=OOR), disparaît (Guidi *et al.*, 2012). Enfin des monosaccharides sont majoritairement présents selon les deux pics intenses à 1033,6582 et 1072,22754 cm⁻¹ correspondants respectivement aux liaisons C-O-C et C-O dans le spectre FTIR de l'échantillon d'EPS purifié par une resuspension en DMSO puis une dialyse (Fig. 57A) . Ces pics pour l'échantillon extrait selon le protocole modifié sont à 1035,58667 et à 1066,44214 cm⁻¹ (Fig. 57B) (Bremer et Geesey, 1991 ; Yan *et al.*, 2003 ; Patil *et al.*, 2011 ; Feng *et al.*, 2009). Il est important de noter l'apparition du pic à environ 1550 cm⁻¹ chez les deux échantillons qui est due aux vibrations d'élongation de C-N et de CNH (Guidi *et al.*, 2012). La présence de ce pic ensemble avec le pic à environ 1650 cm⁻¹ dévoile soit la possible contamination avec des protéines, soit la présence d'**acide uronique** et **acide aminé** dans la structure de l'EPS comme décrit dans les analyses de RMN.



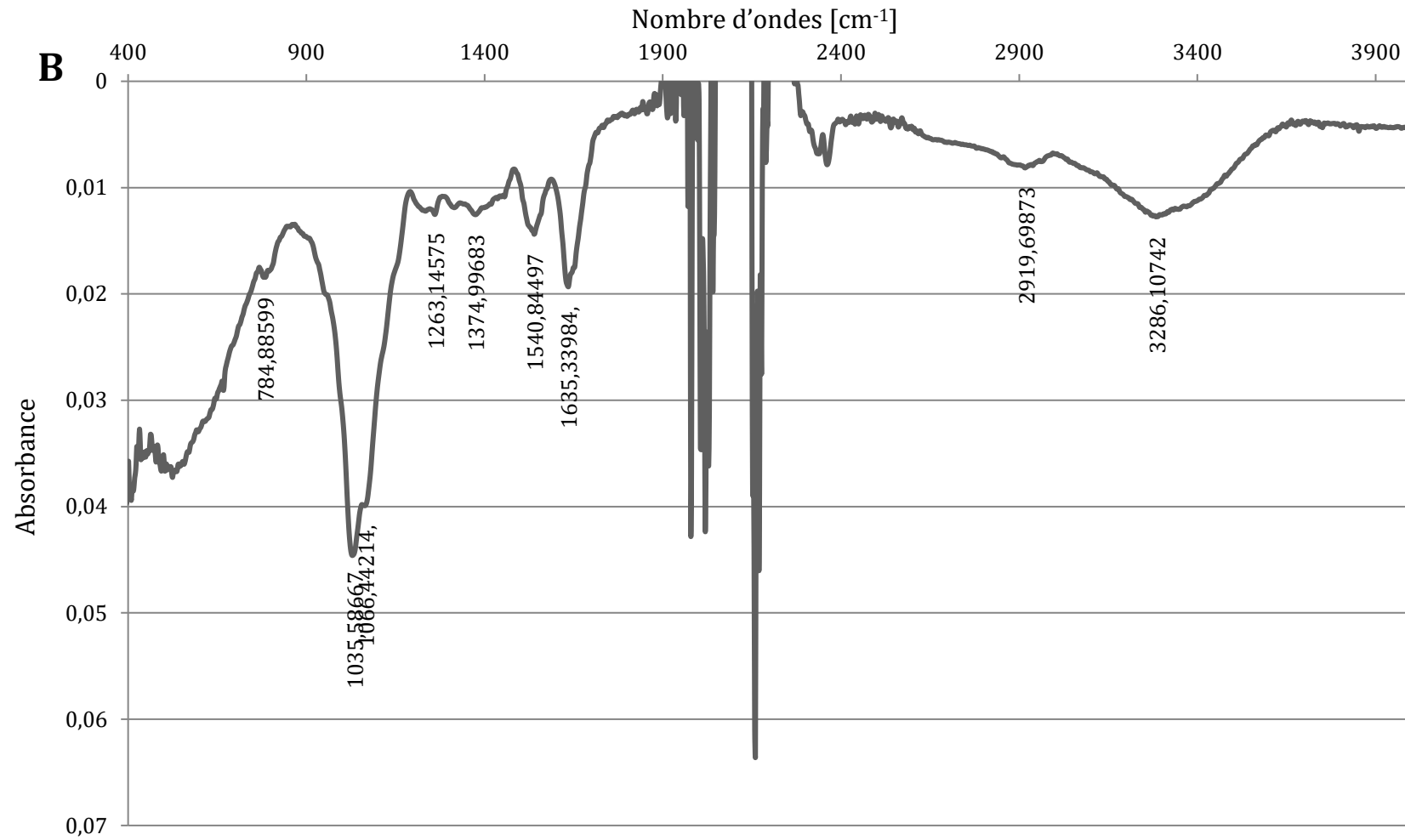


Figure 61: Spectre proche infrarouge (FTIR) d'EPS de Rta purifié par A) une resuspension en DMSO puis une dialyse ou B) extrait selon le protocole modifié

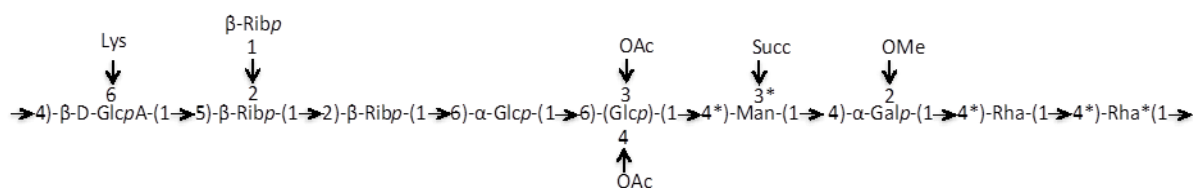
En conclusion de cette partie, nous avons validé que l'échantillon d'EPS de Rta, issu d'une extraction modifiée et d'une purification par resuspension dans le DMSO suivie d'une dialyse, est relativement pur composé essentiellement de monosaccharides, confirmant la nature saccharidique du polymère. Nous avons réussi à éliminer le TCA et nous avons noté une diminution de la contamination en lipides, et la présence possible d'acide uronique et d'acide aminé.

3.4.3. Solubilité d'EPS purifié

Malgré l'élimination du TCA et des lipides, l'EPS de Rta reste insoluble en concentration finale 0,1 % dans 0,1 M NaCl, même après ajustement du pH, agitation et un chauffage progressif de 40 °C à 90 °C. Pour comprendre le caractère insoluble de cet EPS, des analyses plus approfondies de sa structure sont nécessaires. Une désacétylation de l'EPS entraînant un changement de sa conformation pourrait permettre d'atteindre cet objectif.

4. Conclusion

L'EPS de Rta, fermement attaché à la surface bactérienne, a été extrait avec succès en utilisant du TCA. Cet acide permet de détacher l'EPS des cellules bactériennes et simultanément de le purifier en dénaturant et en précipitant les protéines et les acides nucléiques de plus de 20 nucléotides. Selon l'analyse élémentaire et en FTIR, l'EPS extrait est constitué des unités saccharidiques avec la présence possible d'acides aminés. Les monosaccharides impliqués dans sa structure, selon les analyses en CPG, sont le ribose, glucose, galactose, mannose. Tandis que le glucose et le galactose sont les monomères les plus répandus parmi les polysaccharides bactériens, le ribose est rarement décrit comme composant des unités répétées des EPS bactériens. Les analyses de FTICR-MS et de RMN confirment que la présence de ribose, qui n'est pas la seule caractéristique originale de l'EPS de Rta. Les deux analyses sont complémentaires et permettent de proposer une structure de l'unité répétée d'EPS de Rta constitués de dix motifs saccharidiques (**décasaccharide**) qui inclut des monosaccharides rares comme le ribose et le rhamnose, un acide aminé, la lysine, et des substitutions de type acétyle, succinyle et méthyle :



La présence de 3 riboses, 2 glucoses, 1 galactose et 1 mannose dans cette structure est en accord avec les analyses en CPG après méthanolyse (ratios 3/2/1,4/0,7) (Fig. 48, p. 107). Sur le profil chromatographique en CPG de l'EPS de Rta hydrolysé par une méthanolyse, les pics correspondant au rhamnose sortent probablement juste avant celui du ribose (Fig. 47, p. 106).

Le spectre FTIR confirme la présence d'un méthyle, d'un substituant *o*-acétyle, d'un acide uronique et d'un acide aminé.

La structure de l'EPS de Rta est très originale mais certains détails restent à confirmer, vu que pour les analyses RMN nous avons utilisées le spectre 1D ^1H et les corrélations TOCSY et HSQC. Il serait utile de confirmer la structure proposée en complétant les résultats RMN avec le spectres 1D- ^{13}C et les séquences NOESY et HMBC qui permettraient de repérer l'enchaînement et l'assemblage des unités identifiées dans le spectre. Nous avons également montré que l'EPS est coloré au Calcofluor-white suggérant la présence des liaisons de type β 1-3 et/ou β 1-4 qui ne sont pas impliquées dans la structure proposée.

D'un point de vue industriel, la structure d'un polymère est un point très important mais la production d'un EPS est rentable si ce dernier possède des propriétés rhéologiques intéressantes, permettant sa commercialisation. La solubilisation d'EPS de Rta en phase aqueuse était la première étape pour la réalisation des analyses rhéologiques. Nous avons constaté que ce polymère était insoluble dans de l'eau ou dans une solution saline, même après des traitements comme ajustement du pH, chauffage, agitation continue, sonication puissante. Nous avons toutefois réussi à solubiliser l'EPS dans le DMSO. Cette insolubilité est probablement due à la présence des acétates dans la structure d'EPS et certainement pas à la présence des autres composants comme des lipides. Une désacétylation de l'EPS de Rta entraînant un changement de sa conformation pourrait permettre sa solubilisation.

Chapitre 3 :

Déterminants génétiques de
la production de l'EPS de
R. tataouinensis *TTB310*

1. Introduction

Après avoir optimisé la production d'EPS par la souche *R. tataouinensis* TTB310 (Rta) (Chapitre 1) et avoir analysé sa structure (Chapitre 2), nous avons voulu identifier les déterminants génétiques de sa biosynthèse. Sachant que l'EPS de Rta possède une structure complexe analysée dans le Chapitre 2, nous avons souhaité compléter l'approche biochimique par une approche génétique. La détermination du cluster de gènes responsables de la synthèse d'EPS peut également permettre de fournir les outils génétiques nécessaires à la construction de mutants affectés dans sa biosynthèse.

Dans ce chapitre nous avons donc cherché à identifier les déterminants génétiques de la production d'EPS par les kystes de Rta. Pour cela nous avons, dans un premier temps, ciblé deux clusters de gènes potentiellement responsables de la synthèse d'EPS. Cela a été rendu possible par le fait que le génome de Rta a été entièrement séquencé (De Luca *et al.*, 2011). Nous avons ensuite vérifié l'implication de ces clusters dans la synthèse d'EPS en évaluant, par RT-PCR, leur expression par les kystes de Rta. Pour ce faire, l'obtention préalable de cultures de Rta enrichies en kystes (et en bâtonnets comme témoin) a été nécessaire. Nous avons donc utilisé deux mutants de Rta disponibles au LEMiRE et qui avaient été construits par Gilles DE LUCA. Le premier est le mutant $\Delta RthmuO$ portant une mutation dans le gène codant une hémoxygénase, ayant comme phénotype une production de kystes majoritairement, et le second, $\Delta RtBphP1$, portant une mutation dans le gène codant le bactériophytochrome BphP1, ne produisant que des bâtonnets. Le promoteur du cluster sélectionné, permettant de mettre en évidence une expression plus forte de ces gènes chez les cultures de kystes, a été validé. Ce promoteur a ensuite été utilisé pour la construction des fusions transcriptionnelles avec un gène codant une protéine fluorescente *egfp*.

J'ai réalisé et interprété la totalité des expériences présentées dans ce Chapitre 3 avec l'aide technique de Sylvain FOCESATO (LEMiRE).

1.1. Choix et ciblage des clusters de gènes potentiellement responsables de la synthèse de l'EPS

Généralement chez les bactéries, les protéines impliquées dans la synthèse et le transport d'EPS sont codées par des clusters de gènes opéroniques (Whitfield et Roberts, 1999). Ces opérons peuvent également contenir des gènes codant la synthèse de précurseurs ainsi que des gènes régulateurs (Whitney et Howell, 2013 ; Schmid *et al.*, 2015).

Pour la synthèse des EPS bactériens, les principales enzymes impliquées sont les glycosylhydrolases (GHs) et les glycosyltransférases (GTs). Les glycosyltransférases assemblent des monosaccharides activés en chaînes linéaires ou ramifiées. Chez Rta, les 40 gènes codants des glycosyltransférases ont été localisés dans différentes régions du génome. Dans ces régions, contenant des GTs, nous avons identifié les gènes qui les entourent. En recherchant des gènes codant des protéines pouvant être impliquées dans la biosynthèse d'EPS à proximité de ces GTs, nous avons identifié deux clusters potentiellement impliqués dans la production d'EPS par Rta.

Le premier cluster de gènes (**cluster 1**) commence par le gène Rta_08680 codant une

dTDP-Glu 4,6-déhydratase et finit avec le gène Rta_08810 codant une β -glycosyltransférase (Fig. 62). Il est composé de 14 gènes.

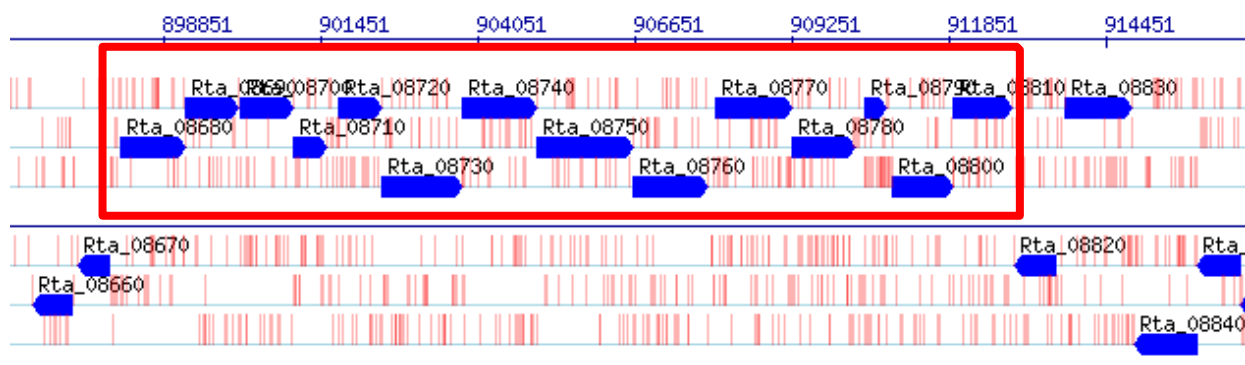


Figure 62: Disposition et description du cluster 1 de gènes (entourés par un carré rouge) potentiellement responsables de la synthèse d'EPS chez Rta

Lègende des gènes :

- Rta_08680 Candidate dTDP-Glu 4,6-déhydratase
- Rta_08690 Candidate dTDP-4-déhydrorhamnose réductase / dTDP-4-keto-L-rhamnose réductase / dTDP-6-déoxy-L-mannose déshydrogénase / dTDP-L-rhamnose synthétase
- Rta_08700 Candidate Glu-1-phosphate thymidyltransférase / dTDP-Glu synthétase / dTDP-Glu-pyrophosphorylase
- Rta_08710 Candidate dTDP-4-déhydrorhamnose 3,5-épimérase / dTDP-keto-6-déoxyglucose 3,5-épimérase / TDP-L-rhamnose synthétase
- Rta_08720 Candidate transporteur ABC de polysaccharide / polyolphosphate qui peut être impliqué dans la biogénèse de l'enveloppe cellulaire (perméase)
- Rta_08730 Protéine liant le transporteur ABC de polysaccharide/polyolphosphate
- Rta_08740 Protéine hypothétique conservée
- Rta_08750 α -Glycosyltransférase, famille 4
- Rta_08760 Glycosyltransférase, famille 46
- Rta_08770 Candidate protéine membranaire
- Rta_08780 Candidate β - Glycosyltransférase, famille 2
- Rta_08790 Candidate protéine membranaire
- Rta_08800 Candidate β - Glycosyltransférase, famille 2
- Rta_08810 Candidate β - Glycosyltransférase, famille 2

Ce cluster 1 contient 5 gènes codant des GTs : Rta_08750, Rta_08760, Rta_08780, Rta_08800 et Rta_08810. Trois d'entre-eux sont des β -glycosyltransférases impliquées dans la formation des liaisons de type β , présentes dans l'EPS de Rta puisque révélées par leur coloration avec le Calcofluor white (cf. paragraphe 1.2., Chapitre 1). Le cluster contient d'autres gènes impliqués dans la synthèse et la modification de nucléotide-diphosphate-monosaccharides, les précurseurs de la synthèse d'EPS. Ces gènes sont Rta_08680, Rta_08690, Rta_08700 et Rta_08710. Deux gènes, Rta_08720 et Rta_08730, codant des protéines faisant partie d'un système de transport de type ABC sont également présents dans ce cluster 1. Selon les données bibliographiques, le système de transport de type ABC peut être impliqué dans le transport des exopolysaccharides. Il est intéressant de noter que parmi les gènes entourant ce cluster 1, qui est très

probablement opéronique, se trouvent les gènes Rta_08820 et Rta_08900 codant des β -glycosyltransférases ainsi que les gènes Rta_08880 et Rta_08890 codant des protéines de système de transport ABC (De Luca *et al.*, 2011). Un peu plus loin, nous avons identifié le gène Rta_08960 qui code une déacétylase de polysaccharide. Ce cluster 1 et les gènes positionnés à proximité sont certainement impliqués dans la synthèse et l'export d'un polysaccharide. Il reste à vérifier si le polysaccharide exporté est bien celui qui se trouve à la surface des kystes. L'existence du gène Rta_08830 situé à proximité de ce cluster 1 et qui est décrit comme codant une transférase d'undécaprenyl-phosphate-N-acétylglucosaminyl-1-phosphate laisse envisager que ce cluster pourrait être impliqué dans la synthèse de la paroi bactérienne qui contient de la N-acétylglucosamine.

L'autre cluster de gènes que nous avons identifié (**cluster 2**) commence avec un gène (Rta_10910) de petite taille (309 bp), qui code une protéine hypothétique, et finit avec le gène Rta_10830 codant probablement une UDP-glucose- ou une UDP-galactose 4-épimerase appartenant aux enzymes de modification de nucléotide-diphosphate monosaccharides (Fig. 63). Les 9 gènes présents dans ce cluster sont probablement organisés en opéron.

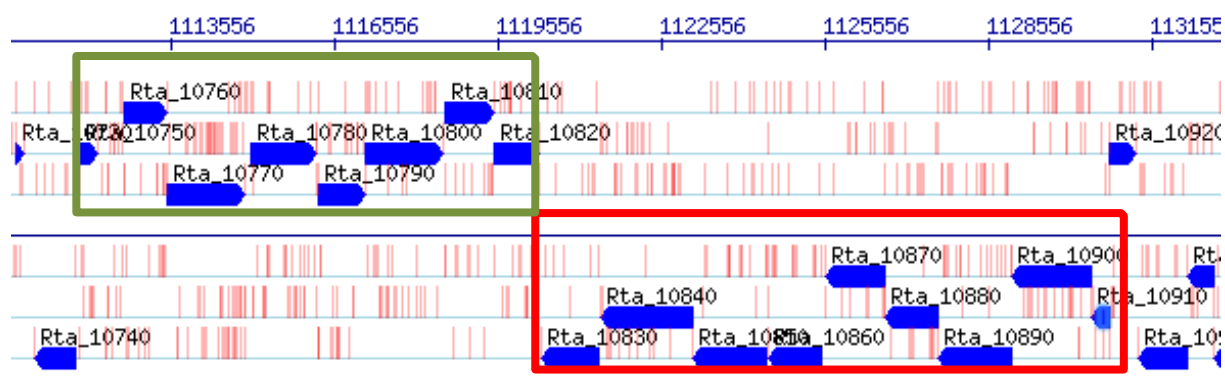


Figure 63: Disposition et description du cluster 2 de gènes ciblés comme potentiellement responsables pour la synthèse d'EPS chez Rta (entourés par un carré rouge). Ce cluster est probablement lié au cluster 3, en amont et en lecture inversée (entouré en carré vert).

Légende des gènes :

Rta_10830	Lointainement apparenté aux UDP-glucose-4-épimerase (Galactowaldenase) (UDP-galactose-4-épimerase)
Rta_10840	Apparenté aux oxidoréductases
Rta_10850	Apparenté aux α - Glycosyltransférases, famille 4
Rta_10860	Candidate β - Glycosyltransférase, famille 2
Rta_10870	Candidate β - Glycosyltransférase, famille 2
Rta_10880	Candidate β - Glycosyltransférase, famille 2
Rta_10890	Candidate protéine membranaire
Rta_10900	Candidate protéine transporteur de succinoglycane
Rta_10910	Protéine hypothétique
Rta_10750	Protéine hypothétique
Rta_10760	Candidate d'un régulateur transcriptionnel EpsA, appartenant à la famille LuxR
Rta_10770	Candidate phosphotransférase de glucose undécaprenyl-phosphate EpsB, protéine membranaire
Rta_10780	Protéine de la superfamille des canaux de la membrane externe, apparentée aux protéines opéroniques de biosynthèse d'EPS, EpsL
Rta_10790	Protéine de la superfamille SLBB, apparenté aux protéines d'export d'EPS, EpsE

Rta_10800	Candidate d'une protéine de la superfamille Wzz, déterminant la longueur de la chaîne polysaccharidique EpsF
Rta_10810	Candidate d'une protéine-tyrosine kinase non-spécifique, EpsG
Rta_10820	Apparentée aux β -glycosyltransférases, Famille 26

Dans ce cluster 2, nous avons retrouvé 4 glycosyltransférases : une α -GT (Rta_10850) et trois β -GTs (Rta_10860, Rta_10870, Rta_10880), ainsi que deux autres gènes, Rta_10890 codant une protéine membranaire, et Rta_10900, codant un transporteur de succinoglycane. Les deux derniers sont liés à l'export de polysaccharide. Nous avons noté qu'en aval de ce cluster de gènes se trouve un autre cluster (**cluster 3**) dans le sens inverse de lecture qui commence par le gène Rta_10750 codant une protéine hypothétique et qui finit avec le gène Rta_10820 codant une glycosyltransférase apparentée aux β -glycosyltransférases. Il contient 8 gènes probablement organisés en opéron. Parmi eux, nous n'avons trouvé qu'une seule glycosyltransférase et plusieurs protéines impliquées dans la synthèse d'un système de transport de polysaccharide. Nous avons également détecté la présence, dans le cluster 3, du gène Rta_10770 codant une phosphotransférase de glucose-undécaprényle-phosphate et du gène Rta_10800 codant une protéine de la superfamille Wzz. Il est possible que les deux clusters (2 et 3) fonctionnent de façon complémentaire. Ainsi le premier (cluster 2) contiendrait des glycosyltransférases nécessaires à la biosynthèse de l'EPS, et le deuxième cluster (cluster 3) le système d'assemblage des unités répétées et de transport. La présence d'un gène pouvant être impliqué dans un transport de type Wzx/Wzy serait en cohérence avec les résultats de l'analyse de la composition de l'EPS (Chapitre 2) puisqu'un tel système est responsable de l'assemblage de divers monosaccharides dans des unités répétées complexes d'hétéropolysaccharides.

1.2. Utilisation des mutants de Rta ne produisant plus d'hémoxigénase ou de bactériophytochrome 1

Un moyen simple pour identifier les déterminants génétiques responsables de la synthèse d'EPS est la comparaison de leur expression dans une culture constituée de kystes et donc productrice d'EPS avec une culture constituée de bâtonnets non-producteurs d'EPS, comme témoin. Ainsi, nous attendons que la culture, constituée essentiellement de kystes, permette de mettre en évidence une forte expression des gènes responsables de la production d'EPS contrairement à la culture constituée de bâtonnets. Pour éviter un biais de quantification de l'expression des gènes pouvant être lié à des différences de paramètres physico-chimiques, les cultures bactériennes doivent être réalisées dans des conditions expérimentales identiques et reproductibles. Avec la souche sauvage de Rta, le ratio "kystes/bâtonnets" est variable selon le stade de croissance et fortement influencé par la présence ou non de lumière. Donc, il faut utiliser une autre stratégie pour obtenir des cultures ne contenant que des kystes ou des bâtonnets dans les mêmes conditions de culture. Pour atteindre cet objectif, nous avons décidé d'utiliser deux mutants de Rta.

Deux mutants de Rta disponibles au laboratoire (LEMIRE), construits par Gilles DE LUCA, nous ont semblé pouvoir répondre à cet objectif. Le premier a été muté dans le gène codant une hémoxigénase ($\Delta RthmuO$) et le deuxième muté dans un des deux gènes codant des bactériophytochromes détectant la lumière rouge ($\Delta RtBphP1$). Ces deux bactériophytochromes sont impliqués dans la détection de la lumière rouge, en amont d'une voie de régulation de la différenciation "kystes-bâtonnets" et de façon plus

générale dans l'adaptation de Rta à la dessiccation. Il a été observé que ces mutants ont des morphologies différentes selon l'intensité de la lumière. Indifféremment, en présence de lumière (700 ou 770 nm) ou à l'obscurité les colonies du mutant $\Delta RtBphP1$ sur TSA/10 sont constituées essentiellement de bâtonnets et celles du mutant $\Delta RtHmuO$ essentiellement de kystes.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches de *R. tataouinensis* utilisées dans ce chapitre sont la souche sauvage *R. tataouinensis* TTB310 (Rta wt), ainsi que deux mutants : le premier a été muté sur gène codant une hémoxigénase ($\Delta RtHmuO$) dont le phénotype est un enrichissement de la culture en kystes (> 99%) et le deuxième ($\Delta RtBphP1$) sur le gène codant l'un des bactériophytochromes de Rta, Bphp1, dont le phénotype est un enrichissement de la culture en bâtonnets (> 99%). Ces souches ont été fournies par Gilles DE LUCA (LEMIRE). Les souches d'*E. coli* GM2163 et TOP10 ont été utilisées pendant les étapes successives de construction des fusions transcriptionnelles.

Les cultures des mutants $\Delta RtBphP1$ et $\Delta RtHmuO$ utilisées pour les extractions d'ARN ont été réalisées en triplicat dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu TSB/10 0,4 % NaCl, supplémenté de kanamycine (concentration finale : 200 µg/mL). La croissance bactérienne a été réalisée à 30 °C, sous agitation (150 rpm) pendant 3 à 5 jours. La durée de croissance des mutants $\Delta RtHmuO$ et $\Delta RtBphP1$ a été fixée à 6 jours. Les milieux pour Rta wt ont été TSB/10 et TSB/10 supplémenté de 10 mM lactate.

Les différentes souches d'*E. coli* ont été cultivées en milieu LB (Luria Broth composé de 1 % de tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2 mM de NaOH) ou SOC (« Super Optimal broth with Catabolic repressor ») composé de 2 % de tryptone, 0,5 % d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ et 20 mM de glucose, à 37 °C et sous agitation (150 rpm). La sélection des transformants a été faite par des ensemencements sur boîte de Petri contenant du milieu LA (milieu LB avec 15 g/L d'agar, Sigma) supplémenté de kanamycine (concentration finale : 50 µg/mL).

Afin de tester l'expression des déterminants génétiques potentiellement impliqués dans la synthèse d'EPS chez Rta, la culture du transformant a été ensemencée sur milieu TSA/10 supplémenté de kanamycine (concentration finale : 200 µg/mL).

2.2. Manipulation d'ADN

2.2.1. Extraction d'ADN de Rta

Rta étant une bactérie difficile à lyser, les durées d'incubation avant l'extraction phénol/chloroforme ont été rallongées. Ainsi un volume de 1 L de culture de Rta dans TSB/10 (ensemencés avec 2,5 mL d'une préculture) après 3 jours de croissance a été récolté par une centrifugation à 15 000 rpm et à 15 °C pendant 30 min. Les culots ont été repris dans de TSB/10 et concentrés en un seul tube par une centrifugation à 10000 rpm à 15 °C pendant 15 min. Par la suite le culot a été repris dans 10 mL d'EDTA 10 mM pH 8,0, additionné de 40 µL de protéinase K à 20 mg/mL (concentration finale : 80 µg/mL),

plus 50 μ L de SDS 20 % (0,1 % final). Les bactéries ont été lysées à 37 °C pendant une nuit. Par la suite une digestion à la RNase à 37 °C pendant 1 h a été réalisée, puis le mélange a été centrifugé à 7500 rpm pendant 15 min. Pour l'extraction "phénol/chloroforme", 10 mL de surnageant « jaune » et 10 mL de phénol (pH 7,9) ont été mélangés, puis le surnageant (phase aqueuse) récupéré et repris dans 5 mL de phénol et 5 mL de chloroforme. Dans ce surnageant, 10 mL de "chloroforme/alcool isoamylique" (24:1) ont été ajoutés. Dans le dernier surnageant (environ 7,5 mL puisqu'on en perd au cours des extractions), 800 μ L d'acétate de sodium 3 M (concentration finale 0,3 M) à pH 5,2, plus 22,5 mL d'éthanol 100 % (3 volumes) ont été ajoutés. Ce mélange est placé à 4 °C pendant 10 min. Un filament blanchâtre d'ADN apparaît instantanément. Après avoir éliminé l'éthanol en réalisant une centrifugation à 7500 rpm pendant 15 min, une dernière étape de rinçage à l'éthanol 70 % a été effectuée à 4 °C. L'ADN a été récupéré après une dernière centrifugation à 7500 rpm et à 4 °C pendant 15 min. Le culot a été repris dans environ 2 mL de Tris HCl 10 mM pH 8,0. La concentration et la pureté de l'ADN ont été vérifiées à l'aide du spectrophotomètre NanoVue.

2.2.2. Extraction et purification de plasmides

Les extractions de plasmides ont été effectuées grâce au kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » (QIAGEN), en suivant les recommandations du fabricant.

2.2.3. Purification de fragments d'ADN

La purification des différents fragments a été réalisée selon le protocole du kit « QIAquick PCR Purification » (QIAGEN), en suivant les recommandations du fabricant.

2.2.4. Séquençage d'ADN

Le séquençage des fragments PCR et des plasmides a été effectué par la société GENEWIZ (Sanger DNA sequencing). Les chromatogrammes ont été visualisés à l'aide du logiciel 4Peaks. Des logiciels d'alignement de séquences, tels que Nucleotide BLAST («Basic Local Alignment Search Tool», NCBI) ou Multalin (GenoToul, Toulouse) ont été utilisés pour vérifier les séquences.

2.2.5. Amplification par PCR (*polymerase chain reaction*)

Les différentes amorces utilisées dans cette étude sont présentées en Annexe 2. Les amplifications par PCR des gènes des deux clusters contenant potentiellement les gènes impliqués dans la synthèse de l'EPS de Rta (clusters 1 et 2) ont été réalisées selon les instructions du fabricant de la Taq polymérase HotStarTaq (QIAGEN). Le milieu réactionnel, par tube est composé de dNTP mix (100 μ M), de tampon PCR (1x), de solution Q (1x), d'amorces (0,5 μ M) et d'1 unité/réaction de polymérase HotStarTaq. La réaction commence par une étape de dénaturation de l'ADN (95 °C pendant 5 min). Cette étape est suivie de 19 à 20 cycles d'amplification pour le gène ADNr 16S, 31 cycles pour les gènes Rta_08680, Rta_08740, Rta_08780 et Rta_08810, 32 cycles pour les gènes Rta_10900, Rta_10850, Rta_10830, Rta_10880 et Rta_10870, comprenant une étape de dénaturation (95 °C pendant 30 s à 1 min), d'hybridation (de 53 °C à 56 °C selon les amorces utilisées, pendant 45 s) et d'élongation (72 °C pendant 1 min selon la longueur du fragment à amplifier). Le mélange a ensuite été maintenu à 72 °C pendant 10 min

pour terminer l'élongation. Les amplifications par PCR ont été réalisées avec environ 50 ng d'ADNc.

Les amplifications par PCR du gène *egfp* et des régions contenant le promoteur du cluster 2 commençant par le gène *Rta_10910* et finissant avec le gène *Rta_10830* ont été réalisées selon les instructions du fabricant de la Taq polymerase Herculanse II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies). Cette ADN-polymérase est extrêmement fidèle et introduit peu de mutations. Sa formulation spéciale et le système tampon optimisé assurent une très bonne performance pour l'amplification des cibles riches en G+C%, ce qui est le cas de *Rta* (G+C% du génome : 70%). Les conditions de réaction ont été les suivantes : une étape de dénaturation de l'ADN (95 °C pendant 2 min) suivie de 30 cycles d'amplification comprenant : une étape de dénaturation (95 °C pendant 30 s), d'hybridation (de 60 °C à 64 °C selon les amorces utilisées pendant 30 s) et d'élongation (68 °C pendant 45 s à 60 s selon la longueur du fragment à amplifier). Le mélange a ensuite été maintenu à 68 °C pendant 8 min pour terminer l'élongation. Les amplifications par PCR ont été réalisées avec 50 ng d'ADNg. En fin d'amplification avec l'Herculanse II, une amplification pendant 10 min à 72 °C a été réalisée avec la GoTaq (Promega) qui possède la particularité d'ajouter des bases A à la fin des produits PCR.

Toutes les amplifications par PCR ont été effectuées avec le thermocycleur C1000 Touch™ (Bio-Rad).

Les produits PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % dans du TAE 0.75X (Tris acétate, EDTA) contenant 0,01 % de BET (p/V) afin d'en contrôler leur qualité. Pour chaque réaction, ont été déposés 5 µL de produit PCR avec 3 µL de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,02 %-xylène cyanol, 0,02 %-glycérol 3 %-TBE). Après migration sous 100 V pendant 20-30 min, les bandes ont été visualisées à l'aide d'un imageur de gels d'électrophorèse (U : Genius, Syngene) : le gel est placé sur une table rétroéclairée par des rayons ultra-violet qui induisent la fluorescence du BET fixé à l'ADN. Un marqueur de poids moléculaire (SmartLadder ou SmartLadder SF, Eurogentec) a été utilisé pour déterminer la taille et la quantité d'ADN présent.

2.3. Manipulation d'ARN

2.3.1. Extraction d'ARN totaux

Deux types d'extraction d'ARN ont été réalisés. Le premier a concerné les cultures de bâtonnets du mutant $\Delta RtbphP1$ et le deuxième les cultures de kystes du mutant $\Delta RthmuO$. Les extractions d'ARN ont été effectuées en réalisant un traitement initial destiné à lyser au mieux les cellules de *Rta* et plus particulièrement les kystes. Chaque culture a été filtrée à l'aide d'un filtre au seuil de coupure 0,2 µm (Whatman). Les filtres ont été récupérés et placés dans des tubes (Eppendorf) avec des billes de broyage Lysing Matrix E (MP Biomedicals). Pour les filtres recouverts de kystes du mutant $\Delta RthmuO$, 200 µL de lysozyme et 20 µL de protéinase K ont été ajoutés. Dans les tubes contenant les filtres recouverts de bâtonnets du mutant $\Delta RtbphP1$, a été ajouté 1 mL de TRIzol. Ensuite tous les filtres ont été traités avec un broyeur FastPrep-24 (MP Biomedicals) pendant 60 s à 6,5 m/s. Les broyats des kystes de $\Delta RthmuO$ ont été incubés par la suite à température ambiante, sous agitation (200 rpm) pendant 30 min. L'extraction d'ARN des lysats de kystes de $\Delta RthmuO$ a été faite avec le kit RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen) selon les recommandations du fabricant, en excluant les étapes d'addition de

RNA protect et en commençant par l'étape d'ajout de réactif RLT supplémenté de β -mercaptoéthanol, suivie par l'extraction proprement dite à l'aide d'un kit de purification d'ARN (« RNeasy Mini Kit », Qiagen), en respectant les recommandations du fabricant. L'extraction d'ARN pour les broyats contenant les bâtonnets de $\Delta RtbphP1$ a été réalisée par la suite avec le réactif TRIzol Reagent (Ambion), selon les recommandations du fabricant.

Afin d'éliminer toute trace d'ADN dans les échantillons, un traitement à la désoxyribonucléase (DNAase) a été effectué à l'aide du kit « TURBO DNA-free » (Ambion) selon les recommandations de fabricant. Les ARN totaux ont été récupérés et leur concentration déterminée à l'aide du spectrophotomètre NanoVue. La qualité d'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,1 % dans du TBE 0,5X (Tris, acide borique, EDTA), contenant 0,01 % de BET (p/V). Les dépôts d'ARN ont été mélangés avec 3 μ L de tampon de charge (bleu de bromophénol 0,02 %-xylène cyanol, 0,02 % - glycérol 3 %-TBE). Après migration sous 100 V pendant 15 min, les bandes ont été visualisées à l'aide d'un imageur de gels d'électrophorèse (U : Genuis, Syngene).

2.3.2. Transcription inverse

Les ARN totaux ont été rétrotranscrits en ADN complémentaires (ADNc) grâce au kit «Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit» (Roche). Après calcul de la concentration de chaque échantillon, 1 μ g d'ARN totaux a été prélevé, puis 2 μ L d'un mélange contenant des amorces hexamériques dont la séquence est aléatoire («Random Hexamer Primer») ont été ajoutés, le volume final étant porté à 13 μ L. Le tout a été dénaturé à 65 °C pendant 10 min et placé immédiatement dans la glace pour éviter la formation de structures secondaires. Les composés suivants ont alors été ajoutés : 4 μ L de tampon de réaction («Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5X conc.»), 0,5 μ L d'inhibiteur d'ARNases («Protector RNase Inhibitor», 40 U/ μ L), 2 μ L de mélange des quatre désoxyribonucléotides (10 mM chacun) et 0,5 μ L de rétrotranscriptase («Transcriptor Reverse Transcriptase»). Le programme utilisé pour réaliser la rétrotranscription a été le suivant : 10 min à 25 °C, puis 30 min à 55 °C. Pour finir, l'enzyme a été incubée 5 min à 85 °C afin de l'inactiver. Pour toutes les réactions PCR, nous avons utilisé 1 μ L d'ADNc. Un gène témoin (ADNr 16S) a été utilisé pour vérifier l'efficacité de la transcription inverse et le fait que chaque échantillon possède la même concentration d'ADNc.

2.4. Digestion enzymatique et ligation

Les plasmides extraits et purifiés ont été digérés avec des enzymes de restriction selon les recommandations du fournisseur (New England Biolabs).

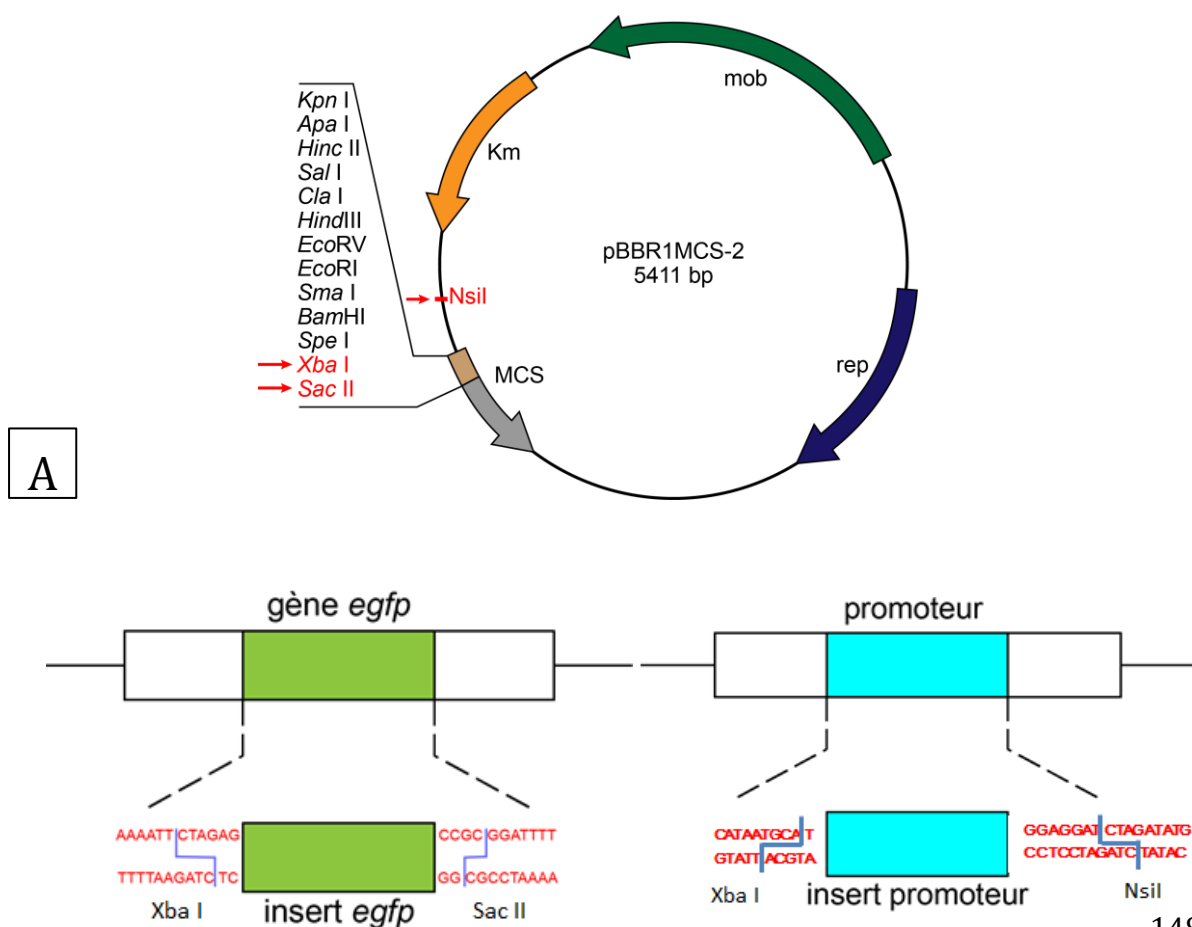
Pour améliorer le rendement de ligation, les plasmides ont été traités à la phosphatase («Antartic phosphatase», New England Biolabs). Cette enzyme catalyse l'élimination du 5'-phosphate et empêche ainsi les plasmides digérés par des enzymes de restriction de se refermer sur eux-mêmes. Le tampon dilué au 1/10 ainsi que 1 μ L de phosphatase ont été ajoutés. Après incubation à 37 °C pendant 15 min, l'enzyme a été inactivée en plaçant le mélange à 65 °C pendant 5 min.

Pour permettre une ligation optimale, les inserts ont été placés en excès (de l'ordre de 3 fois) par rapport au vecteur. Après ajout de tampon de ligation, la ligase (« T4 DNA

ligase », New England Biolabs) a été ajoutée. Le tout a été placé à 4 °C et la ligation s'est effectuée pendant une nuit.

2.5. Construction des vecteurs de fusions transcriptionnelles

Afin de réaliser des fusions transcriptionnelles *egfp*, trois régions en « amont » du cluster 2 commençant par le gène *Rta_10910* et finissant avec le gène *Rta_10830* ont été identifiées comme potentiellement promotrices. La première région, en « amont » du gène *Rta_10900*, a été choisie en se basant sur le fait que le gène *Rta_10910* code une petite protéine hypothétique qui n'est peut-être pas fonctionnelle. La deuxième région est en « amont » de *Rta_10910* et la troisième en « amont » du gène *Rta_10950*. Les régions choisies ont une taille d'environ 330-340 bp et ont été amplifiées à l'aide de l'enzyme Herculanse II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies). Le gène *egfp* a été amplifié par la même enzyme (Fig. 64B). Afin de séquencer les amplicons obtenus, ceux-ci ont été clonés au sein d'un vecteur Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning (Invitrogen), selon les recommandations du fournisseur. Le séquençage garantit que les amplifications PCR n'ont pas généré de mutations. Après cette vérification, une souche chimio-compétente d'*E. coli* GM2163 a été transformée avec les vecteurs pCR-XL-TOPO® contenant les inserts. Les plasmides ont été purifiés, puis digérés par des enzymes de restriction (Fig. 64B). Pour déterminer le niveau d'expression de différents gènes et ainsi leur régulation transcriptionnelle, les régions promotrices du cluster 2 ont été liées au gène *egfp* codant pour la biosynthèse d'une protéine GFP fluorescente (Fig. 64C). Les fragments obtenus ont ensuite été insérés au sein du vecteur pBBR1MCS-2 (Fig. 64A et C). Nous avons utilisé pour cela la T4 DNA ligase (New England Biolabs).



B

C

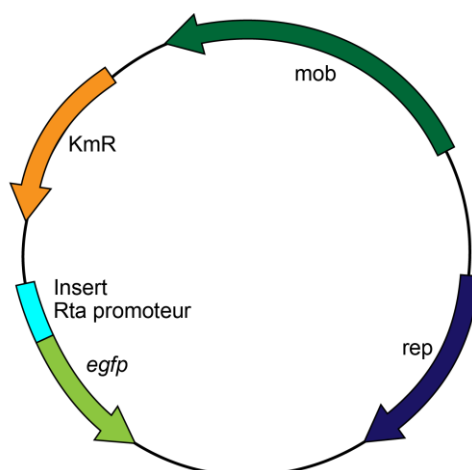


Figure 64: Construction des fusions transcriptionnelles pour quantifier l'expression du cluster 2 de gènes cibles potentiellement impliqués dans la production d'EPS chez Rta. A) Les sites de restriction choisis pour le plasmide pBBR1MCS-2 sont NsiI, Xba I et Sac II. B) Le gène *egfp* ainsi que les régions en « amont » de Rta_10900, Rta_10910 et Rta_10950 ont été amplifiés et digérés avec les enzymes de restriction Xba I, Sac II et NsiI. C) La ligation des trois produits permet l'obtention des fusions transcriptionnelles.

2.6. Transformations

2.6.1. Cellules électro-compétentes

Les cellules de Rta en phase exponentielle (3 jours de culture dans 50 mL de milieu TSB/10) ont été récoltées par une étape de centrifugation à 8000 rpm, à 4 °C pendant 5 min. Le culot a été repris dans 50 mL d'eau ultrapure stérile et froide et centrifugé à nouveau. Cette étape a été répétée 4 fois. Le culot a été finalement repris dans 1 mL d'eau ultrapure stérile et froide. Les cellules compétentes ont été utilisées directement pour les électrotransformations.

2.6.2. Transformation par électroporation des cellules électro-compétentes de Rta

Les transformations des cellules électro-compétentes de Rta ont été réalisées par électroporation de 180 µL de cellules électro-compétentes en présence de 13 µL du produit de ligation du plasmide pBBR1MCS-2 avec les inserts *egfp* et un de trois promoteurs : Rta_prom_10900, Rta_prom_10910 ou Rta_prom_10950. Après l'électroporation sous 2,5 kV pendant 5 ms, 900 µL de milieu TSB/10 ont été ajoutés et les bactéries ont été incubées, sous agitation (150 rpm) à 30 °C pendant 1 h. La sélection des différents transformants a été effectuée par étalement sur boîte de Petri avec du milieu TSA/10 additionné de kanamycine (concentration finale : 200 µg/mL).

2.6.3. Transformation des cellules chimio-compétentes d'*E.coli* par choc thermique

Un volume de 100 µL de cellules chimio-compétentes d'*E. coli* GM2163 ou Top10 a été additionné de 15 µL du vecteur, puis placé dans la glace pendant 30 min. Ensuite, les

cellules ont été incubées à 42 °C pendant 2 min. Un volume de 250 µL du milieu SOC a ensuite été ajouté aux cellules d'*E. coli* Top10 ou 900 µl de LB aux cellules d'*E. coli* GM2163. Ensuite elles ont été incubées à 37 °C sous agitation pendant 1 h. Les cellules ont été étalées sur milieu solide (LA) supplémenté de kanamycine (concentration finale : 50 µg/mL).

2.7. Microscopie de fluorescence

L'activité de chaque promoteur a été détectée par la fluorescence émise après excitation sous UV. Les observations en microscopie de fluorescence ont été faites avec un microscope à contraste interférentiel (BX50, Olympus) équipé avec un objectif x100 (UPlanApo, ouverture numérique = 1,35, immersion d'huile) et une lampe UV. Les images de microscopie obtenues ont été prises avec une caméra CCD (F-View, Olympus). Les bactéries, contenant le plasmide avec le promoteur fonctionnel et le gène *egfp*, excitées avec de la lumière UV émettent dans le vert.

La comparaison de la quantité d'EPS produite a été réalisée en déposant 18 µL d'échantillon sur une lame de microscopie en présence de 1,8 µL de Calcofluor white 0,1 %. Les images ont été obtenues à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (Zeiss LSM780, Carl Zeiss, France), en utilisant l'objectif 63 x à immersion d'huile. Le Calcofluor white est excité à 405 nm et la lumière émet dans une gamme se situant entre 404 et 501 nm. Afin de comparer la quantité d'EPS produite dans les différentes conditions après la prise de photo avec des paramètres standardisés, une autre photo est prise en jouant sur le gain. Plus le gain est modifié en observant toujours la fluorescence, plus l'EPS est épais. Les images en contraste de phase ont été obtenues simultanément avec les images de fluorescence en utilisant un détecteur de lumière transmise. Les images ont été traitées avec le logiciel Zen black.

3. Résultats

Dans ce paragraphe, nous présentons les résultats de travaux visant à identifier les déterminants génétiques responsables pour la synthèse d'EPS chez Rta. Ces résultats ont été obtenus avec l'appui technique de Sylvain FOUCHESATO (LEMIRE). L'identification de ces gènes peut nous apporter de l'information sur le type de mécanismes de biosynthèse et de transport de l'EPS de Rta. Par exemple, selon les clusters ciblés, ce mécanisme de transport pourrait être de type ABC ou de type Wzx/Wzy. Une autre conséquence attendue de l'identification des déterminants génétiques est que nous allons obtenir des informations sur les enzymes impliquées dans la synthèse de l'EPS et cela peut nous donner éventuellement certaines idées sur sa structure. Nous commençons la présentation des résultats par une introduction sur l'obtention des cultures enrichies en kystes et en bâtonnets qui ont été nécessaires pour la quantification de l'expression des gènes cibles impliqués dans la production d'EPS.

3.1. Obtention des cultures enrichies en kystes ou en bâtonnets

Comme nous l'avons évoqué dans le Chapitre 1 la pression osmotique peut avoir des conséquences sur la forme et le volume bactériens (Kramer, 2010). Les résultats les plus intéressants ont été obtenus quand l'inoculum de Rta était déposé sur TSA/10 0,4 % NaCl. Dans ces conditions les colonies de Rta contiennent des agrégats de gros kystes

(Annexe 1). Ces résultats intéressants nous ont donné l'idée de tester la croissance et d'observer la morphologie de deux mutants, $\Delta RtHmuO$ et $\Delta RtBphP1$ qui possèdent des phénotypes "kystes/bâtonnets" contrastés dans un milieu de culture TSB/10. Ainsi les cultures du mutant $\Delta RtHmuO$ dans TSB/10 0,4 % NaCl (+ kanamycine 200 $\mu\text{g/mL}$) ne sont constituées que des kystes et très rarement des bâtonnets. La présence de NaCl n'est pas nécessaire à l'expression de ce phénotype chez $\Delta RtHmuO$ mais amplifie la production d'EPS. Les cultures du mutant $\Delta RtBphP1$ ne contiennent quasiment que des bâtonnets dans le milieu TSB/10. Pour la reproductibilité des résultats, il est important de noter que les milieux ont été inoculés avec des cultures de mutants en phase exponentielle de croissance et que les morphologies décrites s'observent entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour.

Nous avons également remarqué un autre phénomène concernant la taille des kystes de $\Delta RtHmuO$. Les kystes de ce mutant sont plus gros que les kystes de la souche sauvage *Rta* wt dans tous les milieux de culture testés jusqu'à présent (Fig. 65), confirmant une production plus importante d'EPS par le mutant $\Delta RtHmuO$ en présence de 0,4 % NaCl.

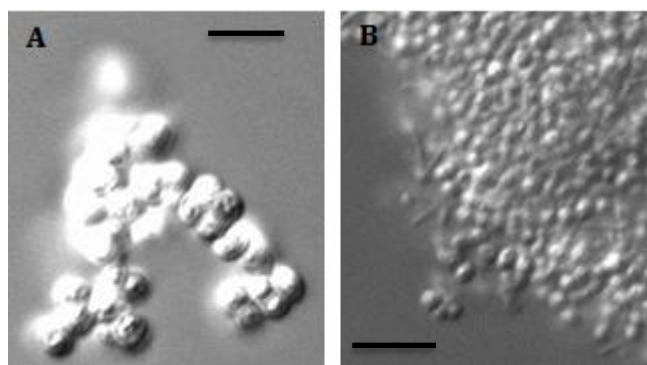


Figure 65: Comparaison de la taille des kystes dans des agrégats de kystes **A)** du mutant $\Delta RtHmuO$ dans le milieu TSB/10 + NaCl 0,4% (+ kanamycine 200 $\mu\text{g/mL}$) Barre d'échelle : 2 μm et **B)** de *Rta* wt dans TSB/10. Les observations sont faites par microscopie optique. Les bactéries ont été cultivées à l'obscurité et à 30 °C pendant 3 jours. Barre d'échelle : 20 μm

Finalement nous avons réussi à obtenir des cultures de $\Delta RtHmuO$ constituées que de kystes et des cultures de $\Delta RtBphP1$ constituées quasiment que de bâtonnets dans les mêmes conditions de culture en utilisant le milieu TSB/10 0,4 % NaCl (+ kanamycine 200 $\mu\text{g/mL}$). Tous les kystes de $\Delta RtHmuO$ obtenus dans ces conditions (+NaCl) sont plus gros par rapport aux kystes de $\Delta RtHmuO$ ou *Rta* wt obtenus en l'absence de NaCl. Il serait intéressant de vérifier que cette augmentation du volume est due à une production plus importante d'EPS.

3.2. Comparaison de la production d'EPS chez le mutant $\Delta RtHmuO$ et la souche sauvage *Rta*

Nous avons voulu vérifier et comparer si la production d'EPS par les kystes du mutant $\Delta RtHmuO$ dans un milieu de culture TSB/10 0,4 % NaCl était plus importante par rapport à celle de *Rta* wt dans les mêmes conditions. Pour ce faire nous avons fait des observations en microscopie confocale qui permet de mesurer la quantité de la lumière émise pendant la fluorescence de l'objet. La mesure est simple à mettre en œuvre, elle implique un premier réglage des paramètres et par la suite une variation du gain. Plus la

fluorescence est maintenue avec la diminution du gain, plus la quantité de polymère est importante.

La production d'EPS par le mutant $\Delta RtHmuO$ dans TSB/10 0,4 % NaCl (+ kanamycine 200 $\mu\text{g/mL}$) est comparée avec celle de Rta wt dans un milieu TSB/10 supplémenté avec du lactate 10 mM ou de 0,4 % NaCl. La fluorescence des kystes de Rta wt est perdue autour d'un gain à 450 nm pour les deux conditions (+ lactate 10 mM ou + 0,4 % NaCl). Donc, il n'existe pas de différence dans la production d'EPS dans ces deux conditions. Alors que la fluorescence des kystes du mutant $\Delta RtHmuO$ est perdue autour d'un gain de 300 nm suggérant qu'ils produisent davantage d'EPS dans un milieu TSB/10 0,4 % NaCl par rapport à la souche sauvage. L'observation que les kystes du mutant $\Delta RtHmuO$ ont une fluorescence plus intense est visible même avec le gain de départ à 595 nm (Fig. 66).

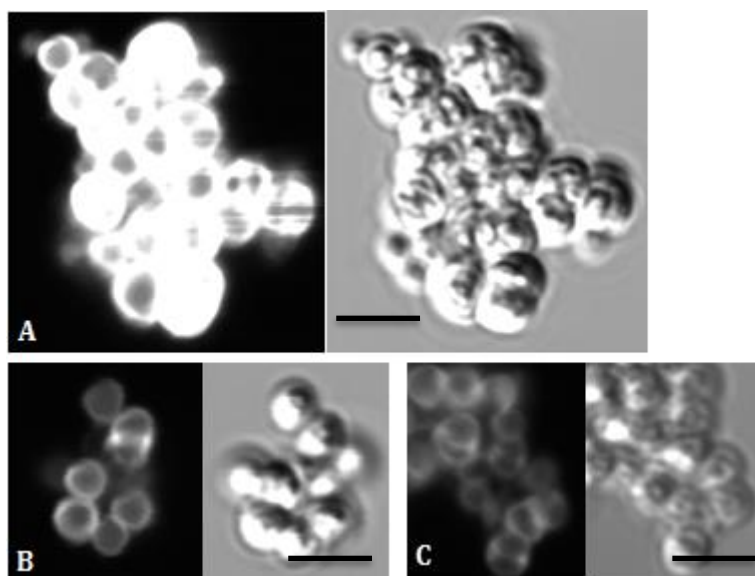


Figure 66: Production d'EPS par les kystes de Rta wt (B et C) et son mutant $\Delta RtHmuO$ (A). Images obtenues en microscopie confocale. Chaque image est constituée de deux observations : à gauche une image de fluorescence avec un gain standard de départ à 595 nm et à droite une image correspondante de microscopie optique. A) $\Delta RtHmuO$ dans un milieu TSB/10 + NaCl 0,4% (+ kanamycine 200 $\mu\text{g/mL}$). B) Rta dans un milieu TSB/10 + NaCl 0,4%. C) Rta dans un milieu TSB/10 + lactate 10 mM. Barre d'échelle : 2 μm

La confirmation de la production plus importante d'EPS par le mutant $\Delta RtHmuO$ nous a conduit à utiliser ce mutant et le milieu de culture TSB/10 0,4 % NaCl pour détecter plus facilement les différences d'expression des déterminants génétiques responsables pour la synthèse d'EPS. Comme $\Delta RtHmuO$ synthétise plus d'EPS, il est logique que les gènes responsables pour cette synthèse soient plus fortement exprimés par rapport aux situations où les kystes ont une production d'EPS plus faible. Ainsi quand nous comparons l'expression des gènes d'intérêt entre les cultures composées de kystes et les cultures composées de bâtonnets, nous devrions avoir un signal plus fort de l'expression des gènes responsables de la production d'EPS.

3.3. Validation de l'implication des gènes candidats dans la production d'EPS

Après avoir choisi les souches à tester et déterminé les conditions de culture favorisant la production de kystes ou de bâtonnets, notre objectif a été de valider

l'implication des clusters de gènes ciblés pour la synthèse d'EPS. Cette validation a été faite en deux étapes. D'abord nous avons confirmé, à l'aide des cultures de $\Delta RtHmuO$, enrichie en kystes, et de $\Delta RtBphP1$, enrichie en bâtonnets, quel était, entre les deux clusters de gènes (clusters 1 et 2) potentiellement impliqués, le cluster contenant les gènes responsables de la synthèse d'EPS. Ensuite, nous avons évalué l'expression de ce cluster chez la souche sauvage Rta.

3.3.1. Niveau d'expression des clusters de gènes candidats

Pour déterminer quel était le cluster de gènes impliqué dans la production d'EPS, les ARN des cultures du mutant $\Delta RtHmuO$, enrichie en kystes, et du mutant $\Delta RtBphP1$, enrichie en bâtonnets, ont été extraits. Cette extraction a été effectuée avec le kit RNAProtect Bacteria Reagent (QIAGEN) pour les deux cultures. Une amplification par PCR des ADNc 16S ("contrôle") a permis de comparer les quantités d'ARN dans les deux échantillons. Les résultats montrent qu'en utilisant le kit RNAProtect Bacteria Reagent (QIAGEN) et après dépôt des produits PCR sur un gel d'électrophorèse, la quantité d'ARN extraite est plus importante pour les cultures du mutant $\Delta RtHmuO$ par rapport à celles du mutant $\Delta RtBphP1$ (Fig. 67). Pour essayer d'obtenir les mêmes quantités d'ARN pour les deux types de cultures nous avons effectué une extraction au TRIzol Reagent (Ambion). Cette extraction a donné des bons rendements en ARN pour le mutant $\Delta RtBphP1$, comparables avec ceux obtenus avec le mutant $\Delta RtHmuO$, obtenus avec le kit RNAProtect Bacteria Reagent (QIAGEN) (Fig. 67). Cependant avec une extraction au TRIzol nous n'avons pas réussi à obtenir des concentrations correctes en ARN pour les cultures de $\Delta RtHmuO$. Donc, finalement nous avons gardé l'extraction au TRIzol des ARN pour les cultures de $\Delta RtBphP1$ et au kit RNAProtect pour les cultures de $\Delta RtHmuO$.



Figure 67: Quantification d'ARN extrait avec de TRIzol ou de kit RNAProtect par RT-PCR des ARNr 16S des cultures de $\Delta RtHmuO$ et $\Delta RtBphP1$. Les deux cultures ont été réalisées dans un milieu TSB/10 0,4 % NaCl (+ kanamycine : concentration finale 200 μ g/mL), à 30 °C et sous agitation (150 rpm.) Les extractions d'ARN ont été réalisées après 4 jours de culture.

Après avoir extrait des quantités en ARN équivalentes pour les cultures des mutants $\Delta RtHmuO$ et de $\Delta RtBphP1$, nous avons testé l'expression de certains gènes appartenant aux deux clusters choisis sur la base d'une analyse bioinformatique. L'intensité des bandes, obtenues sur gel d'électrophorèse après PCR des ARNm cibles, permet d'évaluer le niveau d'expression des gènes cibles. Les gènes responsables de la synthèse d'EPS doivent être plus fortement exprimés dans les cultures enrichies en kystes (mutant $\Delta RtHmuO$) par rapport aux cultures de $\Delta RtBphP1$, enrichies en bâtonnets.

L'implication du cluster 1, commençant avec le gène Rta_08680 et finissant avec le gène Rta_08810, a été évaluée en quantifiant l'expression de 4 des 14 gènes de ce

cluster. Ces 4 gènes sont : le premier gène Rta_08680 (candidat pour une dTDP-Glu 4,6-déhydratase), le dernier gène Rta_08810 (candidat pour une β -glycosyltransférase, famille 2) et deux autres gènes au milieu de ce cluster, le gène Rta_08780 (candidat pour une β -glycosyltransférase de la famille 2) et le gène Rta_08740 (candidat pour une protéine hypothétique conservée). Les résultats montrent une expression supérieure des quatre gènes sélectionnés dans le cluster 1 dans les cultures du mutant $\Delta RtbphP1$ dont la culture est enrichie en bâtonnets (Fig. 68). Cela indique que ce cluster 1 n'est pas impliqué dans la synthèse d'EPS chez Rta, mais plutôt dans la synthèse de la paroi bactérienne.

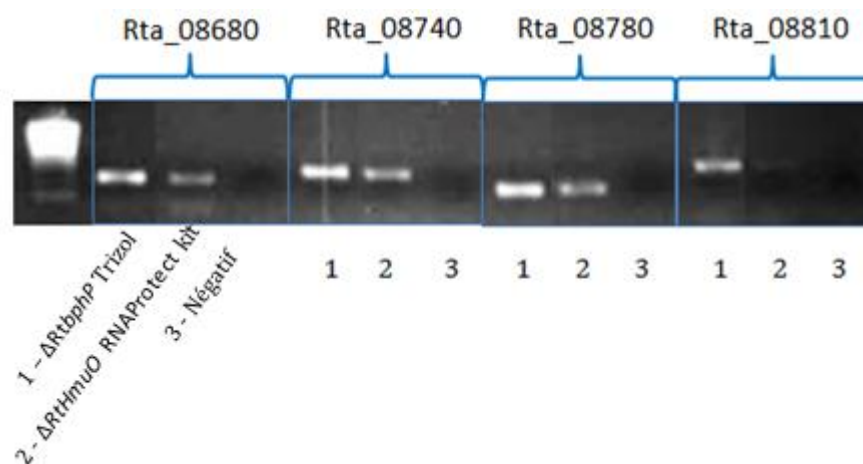


Figure 68 : Expression des gènes Rta_08680, Rta_08740, Rta_08780 et Rta_08810 (**cluster 1**) chez les mutants $\Delta RtbphP1$ (enrichissement en bâtonnets) et $\Delta RtHmuO$ (enrichissement en kystes). Les deux cultures de mutants ont été réalisées dans un milieu TSB/10 + NaCl 0,4 % (+ kanamycine : concentration finale 200 μ g/mL), à 30 °C et sous agitation (150 rpm). Les extractions d'ARN étaient exécutées au quatrième jour de culture.

Pour tester l'implication du cluster 2 dans la synthèse d'EPS, cluster commençant avec le gène Rta_10910 et finissant avec le gène Rta_10830, nous avons choisi de quantifier l'expression de 4 des 9 gènes de ce cluster 2. Ces 4 gènes sont les suivants : le gène Rta_10900 au début du cluster (candidat pour une protéine de transport de succinoglycane), le gène Rta_10830 en fin de cluster (candidat pour une protéine apparentée aux UDP-glucose 4-épimérase, galactowaldénase et UDP-galactose-4-épimérase). Les deux autres gènes, Rta_10870 et Rta_10880, situés au milieu du cluster 2, codent des β -glycosyltransférases de la famille 2 (GT2). La vérification de l'expression de ces gènes a été faite sur des ARN extraits à partir de cultures des mutants $\Delta RtbphP1$ en duplicat et de $\Delta RtHmuO$ en triplicat. Les quantités d'ARN extraits sont légèrement supérieures pour les cultures de $\Delta RtbphP1$, par rapport aux celles de $\Delta RtHmuO$ (Fig. 69).

16S

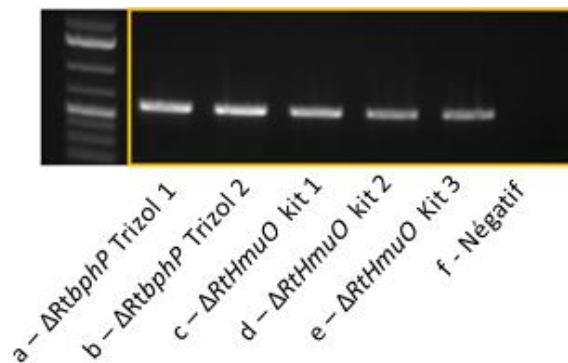


Figure 69 : Quantification d'ARN extrait avec du TRIZOL ou avec le kit RNAprotect par RT-PCR des ARNr 16S des cultures de $\Delta RtHmuO$ (en triplicat) et de $\Delta RtbphP1$ (en duplicat). Les deux types de cultures ont été faites dans un milieu TSB/10 + NaCl 0,4 % (+ kanamycine : concentration finale 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), à 30 °C et sous agitation (150 rpm). Les extractions d'ARN ont été effectuées après 5 jours de culture.

Nous avons observé une expression beaucoup plus forte des quatre gènes sélectionnés dans le cluster 2 dans les cultures de $\Delta RtHmuO$ enrichies en kystes par comparaison avec les cultures du mutant $\Delta RtbphP1$ enrichies en bâtonnets (Fig. 70). Nous mettons en évidence que ce cluster 2 est bien impliqué dans la synthèse d'EPS chez Rta. Il est intéressant de noter que certains gènes, notamment Rta_10900 et Rta_10870, soient légèrement exprimés également chez les cultures du mutant $\Delta RtbphP1$. Cela signifie que ces gènes sont probablement transcrits également chez les bâtonnets de Rta.

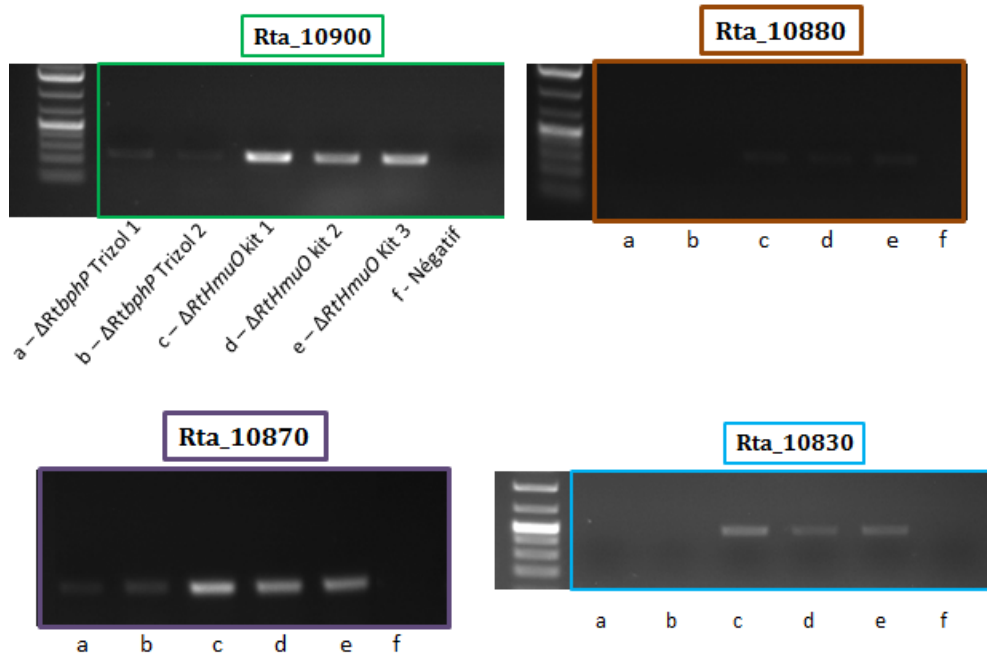


Figure 70: Expression des gènes Rta_10900, Rta_10880, Rta_10870 et Rta_10830 chez les mutants $\Delta RtHmuO$ et $\Delta RtBphP1$. Les deux types de cultures ont été faits dans un milieu TSB/10 NaCl 0,4 % (+ kanamycine : concentration finale 200 $\mu\text{g/mL}$), à 30 °C et sous agitation (150 rpm). Les extractions d'ARN ont été effectuées après 4 jours de culture.

En conclusion de cette partie, nous avons tout d'abord optimisé les méthodes d'extraction d'ARN, avec du TRIzol Reagent (Ambion) pour les cultures de $\Delta RtBphP1$ et avec le kit RNAProtect Bacteria Reagent (QIAGEN) pour celles de $\Delta RtHmuO$. Ensuite, nous avons mis en évidence que seul le cluster 2, commençant par le gène Rta_10910 et finissant avec le gène Rta_10830, est impliqué dans la synthèse d'EPS chez Rta. L'autre cluster (cluster 1), commençant par le gène Rta_08680 et finissant avec le gène Rta_08810, n'est pas impliqué dans la biosynthèse de l'EPS et pourrait être impliqué dans la synthèse de la paroi cellulaire.

3.3.2. Validation de l'expression du cluster ciblé chez *Rta*

Après avoir validé l'implication du cluster 2 dans la synthèse d'EPS chez Rta à l'aide de deux mutants, nous avons voulu évaluer son expression chez la souche sauvage de Rta. Avec cette expérience, nous attendons que les kystes et les bâtonnets de Rta wt aient un signal différentiel d'expression du cluster 2. Pour cela, nous avons transformé la souche sauvage Rta avec des fusions transcriptionnelles de trois promoteurs potentiels du cluster 2 avec le gène *egfp* inséré au sein du vecteur pBBR1MCS-2. Trois régions contenant probablement le promoteur du cluster 2 ont été choisies en "amont" des gènes Rta_10900, de Rta_10910 et de Rta_10950. L'observation microscopique de la fluorescence de la souche Rta wt transformée avec la construction contenant la région en "amont" du gène Rta_10900 a permis de mettre en évidence une forte fluorescence. Les deux autres souches Rta wt transformées avec les constructions contenant les régions en "amont" des gènes Rta_10910 et Rta_10950 n'ont pas donné des signaux de fluorescence. Cela permet de conclure que le promoteur du cluster 2 (ou tout du moins les premiers gènes du cluster 2) se trouve bien dans la région en "amont" de Rta_10900. Cela permet d'en déduire que le gène Rta_10910 codant pour une petite protéine hypothétique (en amont du gène Rta_10900) ne possède pas le même promoteur.

D'après les résultats de l'expression de gènes cibles chez les cultures enrichies en bâtonnets du mutant $\Delta RtBphP1$ et celles enrichies en kystes du mutant $\Delta RtHmuO$, nous nous attendions à voir une forte fluorescence des kystes et un signal plus faible d'expression chez les bâtonnets de la souche Rta transformée. C'est effectivement ce que nous avons observé sur les images de microscopie par fluorescence (Fig. 71).

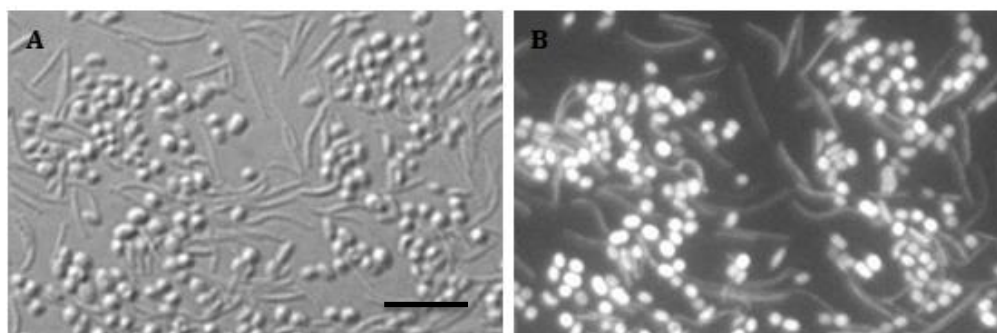


Figure 71: Image en microscopie optique (A) et son image correspondante en microscopie de fluorescence (B) sur le bord d'une colonie de la souche Rta wt transformée avec la fusion transcriptionnelle de la région en « amont » de Rta_10900, contenant le promoteur du cluster responsable pour la synthèse d'EPS, avec le gène *egfp* inséré au sein du vecteur pBBR1MCS-2. Le milieu de culture utilisé est TSA/10 supplémenté de kanamycine (concentration finale : 200 µg/mL), avec une incubation à 30 °C et à l'obscurité. Barre d'échelle : 20 µm.

Au bord de la colonie formée par la souche de Rta transformée avec la fusion transcriptionnelle "promoteur de RT_10900-*egfp*" en amont des gènes responsables de la synthèse d'EPS chez Rta, nous avons observé plusieurs types cellulaires : des bâtonnets et des kystes, ainsi que des bâtonnets et des kystes en division ou en cours de différenciation (Fig. 72). Le premier point à souligner est qu'une grande partie des bâtonnets, les plus éloignés du centre de la colonie, ne sont pas fluorescents (en haut à gauche de la Fig. 67). Cela confirme l'absence de production d'EPS par les bâtonnets impliqués dans la dissémination de la colonie. La très grande majorité des kystes sont fluorescents, avec une intensité variable, confirmant que le cluster 2 contient bien les gènes impliqués dans la production d'EPS par les kystes de Rta. Certains bâtonnets légèrement fluorescents peuvent être interprétés comme étant des bâtonnets en cours de différenciation vers une forme "kyste", avec un début de production d'EPS. De même certains kystes qui ne présentent pas une fluorescence peuvent être interprétés comme étant des kystes en cours de différenciation vers une forme "bâtonnet".

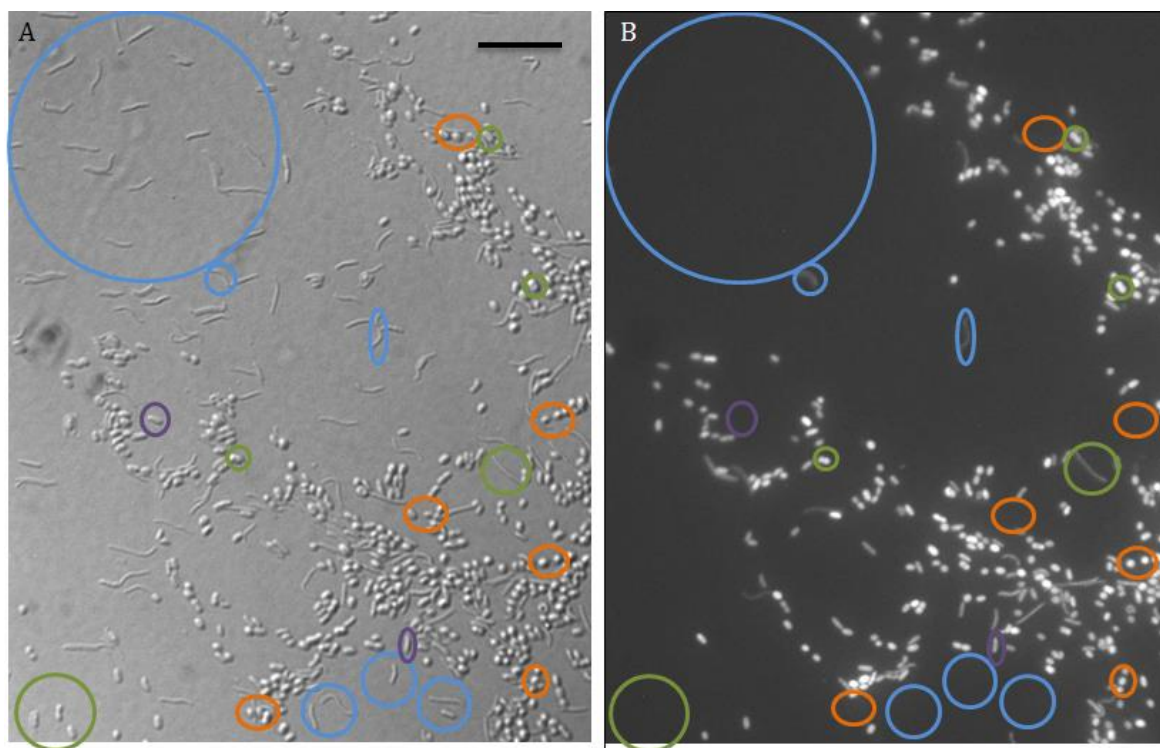
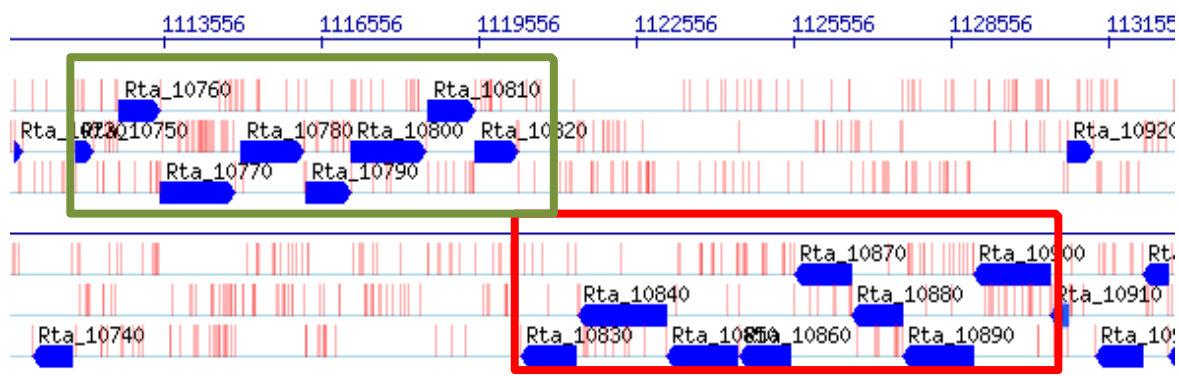


Figure 72: Image en microscopie optique (A) et son image correspondant en microscopie de fluorescence (B) sur le bord d'une colonie de Rta wt transformée avec la fusion transcriptionnelle de la région en « amont » de Rta_10900, contenant le promoteur du cluster 2 responsable pour la synthèse d'EPS, et le gène *egfp*, insérés au sein du vecteur pBBR1MCS-2. Pour une meilleure distinction les cellules de Rta fluorescentes ou pas sont entouré en quatre couleurs différents : bâtonnets (bleu), kystes (orange), cellules en division (vert) et en différenciation (violet). Le milieu de culture utilisé est le TSA/+ kanamycine (concentration finale : 200 µg/mL), avec une incubation à 30 °C et à l'obscurité. Barre d'échelle : 20 µm

4. Conclusions

Dans ce chapitre nous avons mis en évidence que le cluster 2 de gènes, commençant par le gène *Rta_10900* et finissant avec le gène *Rta_10830*, est impliqué dans la synthèse d'EPS par les kystes de *Rta*. Si nous prenons en compte qu'en aval de ce cluster, il existe un autre cluster en lecture inverse commençant par le gène *Rta_10750* et se terminant par le gène *Rta_10820*, qui contient des gènes de transport d'un EPS, nous pourrions faire l'hypothèse que ce cluster est également impliqué dans la synthèse et le transport d'EPS de *Rta*.



Ce cluster (*Rta_10750*-*Rta_10820*) contient certains gènes comme *Rta_10770* codant une phosphotransférase de glucose undécaprényl-phosphate et *Rta_10800* codant pour une protéine de la superfamille Wzz qui est impliquée dans la détermination de la longueur de la chaîne polysaccharidique. La présence de ces deux gènes permet de faire l'hypothèse que la synthèse et le transport d'EPS de *Rta* s'exerce par le mécanisme "Wzx/Wzy". Ce mécanisme de synthèse et de transport d'EPS est réservé aux hétéropolysaccharides, ce qui est le cas de l'EPS de *Rta* tel que nous l'avons identifié dans le Chapitre 2.

Concernant les glycosyltrasférases (GTs) présentes dans le cluster 2 "*Rta_10900* - *Rta_10830*" impliqué dans la synthèse d'EPS et dans le cluster en aval "*Rta_10750* - *Rta_10820*", nous en avons identifié cinq. Généralement chaque GT a un substrat spécifique et, avec peu d'exceptions, utilise un seul type de nucléotides diphosphates (Aharoni *et al.*, 2006). Ce résultat est en cohérence avec la mise en évidence de cinq monosaccharides Glc, Gal, Man, Rib et Rha impliqués dans la structure de l'EPS de *Rta* (Chapitre 2). De plus parmi ces cinq GTs, quatre appartient aux β -glycosyltrasférases et une aux α -glycosyltrasférases, ce qui est en accord avec la présence des liaisons de type α et β dans la structure d'EPS de *Rta*.

Un dernier résultat a également attiré notre attention : l'obtention d'une culture constituée pratiquement que de kystes avec le mutant $\Delta RthmuO$ et sa production très importante d'EPS. Dans le Chapitre 1 nous avons essayé d'obtenir des cultures enrichies en kystes avec la souche sauvage de *Rta*, mais nous n'avons jamais réussi à avoir des cultures homogènes ne contenant que des kystes. L'utilisation du mutant $\Delta RthmuO$ pourrait permettre d'obtenir des quantités plus importantes en EPS et laisse entrevoir aussi la possibilité de rechercher d'autres mutants de *Rta* hyper-producteurs d'EPS.

BILAN ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans une longue tradition depuis près de trente ans de collaboration entre le LEMiRE et la société ARD qui a permis le développement de plusieurs produits industriels commercialisés (Soligel, Eladium et Hydréis), à partir des EPS bactériens isolés au LEMiRE. Au début des années 2000, le LEMiRE, suite à la découverte de la nouvelle espèce bactérienne, *Ramlibacter tataouinensis*, a poursuivi un programme de recherche fondamentale sur cette bactérie à travers des études sur l'altération de phases minérales et sa capacité à tolérer la dessiccation grâce à la production de kystes (capables de se diviser). La publication en 2011 de son génome entièrement assemblé et son annotation experte, a permis l'initiation de plusieurs axes de recherche : cycle cellulaire impliquant le gène *kaiC* et surtout l'étude du contrôle de ce cycle par la lumière impliquant plusieurs bactériophytochromes.

R. tataouinensis TTB310 a été isolée d'un sol semi-désertique du sud tunisien et parmi ses nombreuses originalités, nous nous sommes intéressés à sa tolérance impressionnante à la dessiccation *in natura* et *in vitro*. Cette tolérance avait été observée exclusivement sous forme de kystes. Il a été suggéré que l'EPS produit uniquement par les kystes (facilement observable en microscopie optique et électronique) était responsable de cette propriété de tolérance de la bactérie à la dessiccation. Compte tenu de l'originalité de Rta, et en particulier la seule à ce jour décrite comme étant capable de se diviser sous forme de kystes (mais aussi de bâtonnets), nous avons décidé d'explorer, avec la société ARD, l'intérêt que son EPS pouvait représenter sur le plan industriel.

Cet objectif passait par une étape d'optimisation de la production d'EPS (**Chapitre 1**) qui s'est faite avec la société ARD pour la phase pré-industrielle. C'est chez ARD, sur leur site de Pomacle, que le principal verrou de la croissance de Rta a été levé (nécessité de contrôler le pH).

Les deux autres objectifs de ma thèse étaient de caractériser la composition et la structure de l'EPS par des approches bio- et physicochimiques (**Chapitre 2**) et d'identifier le ou les cluster(s) de gènes, impliqués dans sa production, à partir du génome disponible et à l'aide d'approches de biologie moléculaire (**Chapitre 3**).

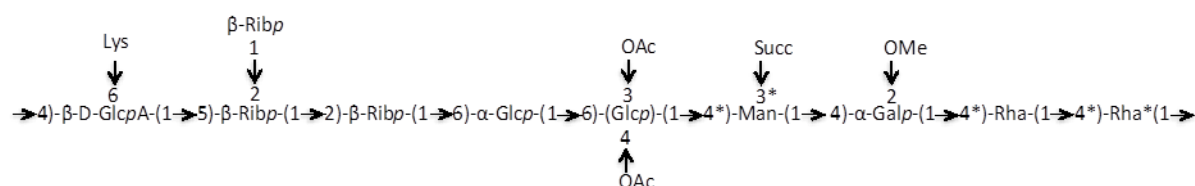
Le dernier objectif qui avait été affiché lors du dépôt du projet à l'ANRT était de déterminer les propriétés rhéologiques de l'EPS. Après avoir fait plusieurs tentatives de solubilisation de l'EPS, nous avons été obligés de renoncer à ce quatrième objectif de la thèse. Les informations obtenues sur la composition de l'EPS, et en particulier la présence d'au moins deux acétates dans l'unité répétée, pourront orienter les choix de modifications chimiques de la molécule pour la rendre plus soluble, par exemple en la déacétylant comme cela a été fait pour l'EPS de *Rhizobium alarii* YAS34 (Villain-Simonnet *et al.*, 2000a et 2000b)

Concernant la première partie, en démarrant ce travail nous disposions de peu d'informations sur la croissance de Rta dans un milieu synthétique (TSB/10). Les études précédentes avaient montré que sa croissance était inhibée dans des milieux riches en C comme le milieu LB ou TSB et impossible avec des sucres tels que le glucose. L'objectif de cette première partie étant d'obtenir une production optimisée d'EPS, nous avons cherché à optimiser la croissance de Rta sous forme de kystes, puisque seuls ces derniers produisent l'EPS. L'originalité de cette démarche d'optimisation de la

production d'EPS est qu'avec Rta nous avons choisi d'optimiser la production d'EPS en une seule phase (kystes en division). Cette méthode est différente de celle utilisée traditionnellement avec des bactéries productrices d'EPS à l'échelle industrielle, consistant à produire de la biomasse cellulaire dans un premier temps puis à induire la production d'EPS en augmentant le C/N du milieu dans un deuxième temps. En effet, l'alternative à la production d'EPS en une seule phase aurait été de produire, dans un premier temps, une biomasse de bâtonnets, puis à induire leur différenciation en kystes producteurs d'EPS. Or cette différenciation s'effectue par une transition "obscurité/lumière" difficile à maîtriser dans un milieu liquide et à mettre en œuvre à l'échelle industrielle.

Suite à l'optimisation de la production d'EPS de Rta en une seule étape, nous avons mis en évidence que le lactate (10 mM) est une source de C et d'énergie qui permet d'augmenter la biomasse de Rta. De plus le contrôle du pH avec de l'acide lactique permet de lever un verrou important de la croissance de Rta dont les cultures atteignent une D.O. de 0,7, soit environ 10^9 cfu/mL en 3-5 jours, à comparer avec une D.O. $\leq 0,1$ en l'absence de contrôle du pH et dans un milieu non optimisé de départ (TSB/10). Cette optimisation de la croissance a été faite en vérifiant que la culture obtenue était bien enrichie en kystes (capables de se diviser). Il faut souligner par ailleurs que le lactate est une source de C compatible avec un développement industriel de la production de l'EPS de Rta, dans la mesure où le lactate, en comparaison par exemple avec le β -hydroxybutyrate, est une molécule qui est produite à bas coût et à l'échelle industrielle. L'obtention d'une culture de Rta enrichie en biomasse de kystes nous a permis de procéder vers les prochaines étapes de cette thèse, notamment l'extraction de son EPS pour afin le caractériser biochimiquement. En effet l'EPS de Rta possède la particularité d'être fermement attaché à la surface cellulaire qui rend son extraction plus complexe par rapport aux EPS communs. Néanmoins, nous avons trouvé un moyen efficace d'extraction impliquant l'utilisation de l'acide trichloroacétique et un protocole fiable qui permet l'obtention d'un échantillon purifié. Par la suite nous avons pu détecter par des analyses élémentaires, des mesures FTIR et des analyses HPLC de la composition lipidique que l'EPS de Rta est constitué essentiellement de motifs saccharidiques.

Nous avons proposé, à l'aide des analyses de FTIR, CPG, FTICR-MS et RMN, une structure originale de l'EPS de Rta, contenant des composants rarement présents chez la majorité des EPS bactériens :



Tout d'abord l'EPS de Rta se distingue par le fait qu'il contient du Rib dans son unité répétée et très peu d'EPS bactériens ont été décrits comme contenant ce monosaccharide dans leur structure. De plus nous avons mis en évidence par un dosage colorimétrique, un gel électrophorèse, des analyses de FTICR-MS et RMN que le Rib n'appartient pas à une chaîne ribonucléique et qu'il est lié aux autres monosaccharides de la chaîne polysaccharidique. Nous avons également mis en évidence la présence d'un autre saccharide relativement rare, le rhamnose. Une autre particularité est la décoration de l'unité répétée de cet EPS par un acide aminé, la lysine. Ceci est un cas spécial et

certainement avec peu d'équivalents décrits jusqu'à présent. Toutefois ce phénomène de décoration est possible chez les bactéries comme montré dans l'étude de l'EPS de *Vibrio alginolyticus* (CNCM I-4994), contenant de l'alanine et de la sérine (Drouillard *et al.* 2015).

La découverte de cinq monosaccharides dans la structure d'EPS de Rta est en cohérence avec le nombre de glycosyltransférases dans les deux clusters de gènes proposés comme responsables pour la synthèse d'EPS. En effet le cluster de gènes « Rta_10900 - Rta_10830 » a été identifié suite à nos travaux comme impliqué dans la synthèse d'EPS. Sa fonction est très probablement couplée avec celle du cluster « Rta_10750-Rta_10820 » et reste à être vérifié par des futurs travaux de recherche. Généralement chaque GT a un substrat spécifique et, avec peu d'exceptions, utilise un seul type de nucléotide diphosphate-saccharide (Aharoni *et al.*, 2006). Donc chacune de ces cinq GTs peut ajouter un monosaccharide différent (Gal, Glc, Man, Rib ou Rha) à la chaîne polysaccharidique pendant sa synthèse. De plus parmi ces cinq GTs, quatre appartiennent aux β -glycosyltransférases et une aux α -glycosyltransférases, ce qui est en accord avec la présence des liaisons de type α et β dans la structure d'EPS de Rta. Néanmoins, selon cette suggestion, il reste à vérifier si dans la structure de l'unité répétée d'EPS nous avons bien l' α -glucopyranose et l' α -galactopyranose qui donneront sur deux α -glycosyltransférases et pas qu'une seule. Nous supposons également que des gènes non compris dans les deux clusters décrits participent dans la synthèse de l'EPS.

À part l'information sur la nature des glycosyltransférases, les deux clusters de gènes « Rta_10750-Rta_10820 » et « Rta_10900-Rta_10830 » nous apporté des connaissances sur le type de synthèse et de transport de l'EPS de Rta. Nous supposons que le cluster « Rta_10750-Rta_10820 » est impliqué dans le transport d'EPS car il contient les gènes Rta_10770, codant une phosphotransférase de glucose undécaprényl-phosphate et Rta_10800, codant pour une protéine de la superfamille Wzz. Ce qui nous amène à faire l'hypothèse que la synthèse et le transport d'EPS de Rta s'exerce par le mécanisme "Wzx/Wzy". Ce mécanisme est réservé aux hétéropolysaccharides comme celui de Rta tel que nous l'avons identifié.

Un dernier résultat est également très intéressant pour des futures perspectives : l'obtention d'une culture constituée pratiquement que de kystes avec le mutant $\Delta RthmuO$ et sa production très importante d'EPS laisse entrevoir la possibilité de rechercher d'autres mutants de Rta hyper-producteurs d'EPS.

Tous ces résultats représentent une première étude sur : (i) l'optimisation de milieu de culture de Rta pour un développement préférentiel de kystes et la production simultanément d'EPS, (ii) la structure de l'EPS de Rta et (iii) la découverte des déterminants génétiques responsables pour la production d'EPS. Ces premiers résultats peuvent faciliter des futures études sur la recherche d'un milieu défini de croissance qui sera conçu de façon à contenir que les composants strictement nécessaires pour le développement de Rta. Cela permettrait d'optimiser le coût du milieu en fonction des besoins de la bactérie, sans impacter son taux de croissance. Un tel milieu serait utile dans les études de l'effet de certains composants sur la croissance, la différenciation bactérienne ou bien la production de l'EPS.

Les résultats sur la structure de l'EPS de Rta sont quasi complets mais restent à éclaircir certains détails sur l'enchaînement des monosaccharides dans l'unité répétée

par des études RMN supplémentaires et plus particulièrement des spectres 1D-¹³C et des séquences NOESY et HMB. Dans les futures études de ces séquences et spectres, il serait très facilitant de se baser sur les interprétations des spectres obtenus dans notre travail.

Ce travail de thèse donne des pistes également pour des études sur la validation de l'implication du cluster « Rta_10750-Rta_10820 » dans la synthèse d'EPS et la recherche des mutants hyper-producteurs d'EPS.

Enfin nous proposons comme sujet de future recherche la solubilisation d'EPS de Rta pour valoriser sa nature et structure exceptionnelle pour de nouvelles applications industrielles.

RÉFÉRENCES

1. Adibekian, A., Stallforth, P., Hecht, M. L., Werz, D.B., Gagneux, P., and Seeberger, P.H. (2011). Comparative bioinformatics analysis of the mammalian and bacterial glycomes. *Chem. Sci.* 2, 337–344.
2. Aharoni, A., Thieme, K., Chiu, C.P.C., Buchini, S., Lairson, L.L., Chen, H., Strynadka, N.C.J., Wakarchuk, W.W., and Withers, S.G. (2006). High-throughput screening methodology for the directed evolution of glycosyltransferases. *Nat. Methods* 3, 609–614.
3. Alföldi, J., Peciar, C., Palovčík, R., and Kováč, P. (1972). Conformation of methyl O-methyl-D-xylofuranosides: a p.m.r. study. *Carbohydr. Res.* 25, 249–252.
4. Allison, D.G., Ruiz, B., SanJose, C., Jaspe, A., and Gilbert, P. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 179–184.
5. Amarger, N. (2001). Rhizobia in the field. *Adv Agron.* 73, 109–168.
6. Arce, V.B., Della Védova, C.O., Downs, A.J., Parsons, S., and Romano, R.M. (2006). Trichloromethyl Chloroformate (“Diphosgene”), ClC(O)OCCL₃: Structure and Conformational Properties in the Gaseous and Condensed Phases. *J. Org. Chem.* 71, 3423–3428.
7. Anwar, H., Strap, J.L., and Costerton, J.W. (1992). Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 1347–1351.
8. Ashwell, G. (1957). Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol.* 3, 73–105.
9. Azeredo, J., Henriques, M., Sillankorva, S., and Oliveira, R. (2003). Extraction of exopolymers from biofilms: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci. Technol.* 47, 175–179.
10. Barrat, J.A., Gillet, P., Lécuyer, C., Sheppard, S.M.F., and Lesourd, M. (1998). Formation of Carbonates in the Tatahouine Meteorite. *Science* 280, 412–414.
11. Barreira, J.C.M., Pereira, J.A., Oliveira, M.B.P.P., and Ferreira, I.C.F.R. (2009). Sugars profiles of different chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and almond (*Prunus dulcis*) cultivars by HPLC-RI. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 38–43.
12. Bauer, S. (2012). Mass spectrometry for characterizing plant cell wall polysaccharides. *Front. Plant Sci.* 3, 45.
13. Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F.N., Durán-Quintana, M.C., and Garrido-Fernandez, A. (2008). Individual effects of sodium, potassium, calcium, and magnesium chloride salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* growth. *J. Food Prot.* 71, 1412–1421.
14. Becker, A., Küster, H., Niehaus, K., and Pühler, A. (1995). Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 249, 487–497.
15. Benzerara, K., Barakat, M., Menguy, N., Guyot, F., De Luca, G., Audrain, C., and Heulin, T. (2004). Experimental colonization and alteration of orthopyroxene by the pleomorphic bacteria *Ramlibacter tataouinensis*. *Geomicrobiology Journal* 21, 341–349.
16. BeMiller J. N, and Wistler R. L. (1996). Carbohydrates. In: Food Chemistry, O. R. Fennema, ed. (New York: Marcel Dekker), pp. 157–223.
17. Bergersen, F.J. (1960). The growth of *Rhizobium* in synthetic media. *Austral. J. Biol. Sci.* 14, 349–360.
18. Berteau, O., and Stenutz, R. (2004). Web resources for the carbohydrate chemist. *Carbohydr. Res.* 339, 929–936.

19. Bhandari, P., Kumar, N., Singh, B., and Kaul, V.K. (2008). Simultaneous determination of sugars and picrosides in *Picrorhiza* species using ultrasonic extraction and high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* 1194, 257–261.
20. Bian, W., Chandrasekaran, R., and Rinaudo, M. (2002). Molecular structure of the rhamnan-like exocellular polysaccharide RMDP17 from *Sphingomonas paucimobilis*. *Carbohydrate Research* 337, 45–56.
21. Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., and Stone, B.A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* 113, 291–299.
22. Bliss, J.M., and Silver, R.P. (1996). Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol. Microbiol.* 21, 221–231.
23. Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* 54, 484–489.
24. Bramhachari, P.V., Kishor, P.B.K., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B.R., and Dubey, S.K. (2007). Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 44–51.
25. Breedveld, M.W., Zevenhuizen, L.P., Canter Cremers, H.C., and Zehnder, A.J. (1993). Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 1–8.
26. Bremer, P.J., and Geesey, G.G. (1991). An evaluation of biofilm development utilizing non-destructive attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Biofouling* 3, 89–100.
27. Bresin, A., Rinaudo, M., Heyraud, A., Santaella, C., De Baynast, R., and Heulin, T. (2008). Production industrielle d'un polysaccharide bactérien luttant contre le stress hydrique. In *Techniques de l'Ingénieur*, (TI Paris), pp. 1–7.
28. Brivonese, A.C., and Sutherland, I.W. (1989). Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 30, 97–102.
29. Broadbent, J.R., McMahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J., and Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Dairy Sci.* 86, 407–423.
30. Bronner, D., Sieberth, V., Pazzani, C., Roberts, I.S., Boulnois, G.J., Jann, B., and Jann, K. (1993). Expression of the capsular K5 polysaccharide of *Escherichia coli*: biochemical and electron microscopic analyses of mutants with defects in region 1 of the K5 gene cluster. *J. Bacteriol.* 175, 5984–5992.
31. Bubb, W.A. (2003). NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. *Concepts Magn. Reson.* 19A, 1–19.
32. Bueno, S.M., and Garcia-Cruz, C.H. (2006). Optimization of polysaccharides production by bacteria isolated from soil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 296–301.
33. Bush, C.A., Martin-Pastor, M., and Imberty, A. (1999). Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 269–293.
34. Bush, C.A. (1966). Polysaccharides and complex oligosaccharides. In: *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, (Chichester: John Wiley & Sons Ltd.), pp. 3746–3750.
35. Capron, I., Brigand, G., and Muller, G. (1998). Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* 23, 215–225.
36. Cartee, R.T., Forsee, W.T., Jensen, J.W., and Yother, J. (2001). Expression of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 synthase in *Escherichia coli*. Assembly of type 3 polysaccharide on a lipid primer. *J. Biol. Chem.* 276, 48831–48839.

37. Castellari, M., Versari, A., Spinabelli, U., Galassi, S., and Amati, A. (2000). An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 23, 2047–2056.
38. Castro, A.G. de, Bredholt, H., Strøm, A.R., and Tunnacliffe, A. (2000). Anhydrobiotic Engineering of Gram-Negative Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4142–4144.
39. Cataldi, T.R.I., Campa, C., and De Benedetto, G.E. (2000). Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368, 739–758.
40. Cerning, J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 113–130.
41. Cerning, J., Renard, C.M., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., and Topisirovic, L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3914–3919.
42. Chambers, R.E., and Clamp, J.R. (1971). An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochem. J.* 125, 1009–1018.
43. Chamba, J.F., Duong C., Fazel A., and Prost F. (1994). Sélection des souches de bactéries lactiques. In *Bactéries Lactiques*, H. De Roissart, and Luquet F.M., eds. (Paris: Loriga, Uriage, Lavoisier), pp. 499–521.
44. Chauhan, P.S., and Saxena, A. (2016). Bacterial carrageenases: an overview of production and biotechnological applications. *3 Biotech* 6, 146.
45. Chawla, P.R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., and Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 107–124.
46. Chong, B.F., Blank, L.M., McLaughlin, R., and Nielsen, L.K. (2005). Microbial hyaluronic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 341–351.
47. Chopin, T., Kerin, B.F., and Mazerolle, R. (1999). Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the *Gigartinales*, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycol. Res.* 47, 167–188.
48. Ciancia, M., and Cerezo, A. S. (1993). Autohydrolysis of polysaccharides. *Carbohydr. Res. Brazil* 45, 54–61.
49. Comte, S., Guibaud, G., and Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS: Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb²⁺ and Cd²⁺ complexation. *Enz. Microb. Technol.* 38, 246–252.
50. Corpe, W.A. (1964). Factors influencing growth and polysaccharide formation by strains of *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.* 88, 1433–1441.
51. Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., and Marrie, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464.
52. Crapart, S., Ernenwein, C., Bresin, A., Logeatn K., Heulin, T., Achouak, W., Heyraud, A., and Vanhaverbeke, C. (2012). Procédé de préparation de compositions de polysaccharides bactériens, de mouûts de fermentations les comprenant, et les utilisations desdites compositions. French patent no. 12/52871, 29 March 2012.
53. Cui, J.-D., and Qiu, J.Q. (2012). Production of extracellular water-insoluble polysaccharide from *Pseudomonas* sp. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4865–4871.
54. Cuthbertson, L., Mainprize, I.L., Naismith, J.H., and Whitfield, C. (2009). Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in gram-negative bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 155–177.
55. Cuthbertson, L., Kos, V., and Whitfield, C. (2010). ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 341–362.

56. Cyr, N., and Perlin, A.S. (1979). The conformations of furanosides. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *Can. J. Chem.* 57, 2504–2511.
57. Dams-Kozłowska, H., Mercaldi, M.P., Panilaitis, B.J., and Kaplan, D.L. (2008). Modifications and applications of the *Acinetobacter venetianus* RAG-1 exopolysaccharide, the emulsan complex and its components. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 201–210.
58. Daniels, C., Griffiths, C., Cowles, B., and Lam, J.S. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen chain length is determined before ligation to lipid A core. *Environ. Microbiol.* 4, 883–897.
59. Datta, C., and Basu, P.S. (1999). Production of extracellular polysaccharides by a *Rhizobium* species from root nodules of *Cajanus cajan*. *Acta Biotechnol.* 19, 59–68.
60. Davidek, T., Clety, N., Devaud, S., Robert, F., and Blank, I. (2003). Simultaneous quantitative analysis of maillard reaction precursors and products by high-performance anion exchange chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7259–7265.
61. De León, A., García, B., Barba de la Rosa, A.P., Villaseñor, F., Estrada, A., and López-Revilla, R. (2003). Periplasmic penicillin G acylase activity in recombinant *Escherichia coli* cells permeabilized with organic solvents. *Process Biochemistry* 39, 301–305.
62. De Luca, G., Barakat, M., Ortet, P., Fochesato, S., Jourlin-Castelli, C., Ansaldi, M., Py, B., Fichant, G., Coutinho, P.M., Voulhoux, R., et al. (2011). The cyst-dividing bacterium *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 genome reveals a well-stocked toolbox for adaptation to a desert environment. *PLOS ONE* 6, e23784.
63. De, P.S., and Basu, P.S. (1996). Production of extracellular polysaccharides by a *Rhizobium* species from the root nodules of *Tephrosia purpurea* Pers. *Acta Biotechnol.* 16, 155–162.
64. De Souza, A.M., and Sutherland, I. W. (1994). Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 463–468.
65. De Vuyst, Vanderveken, Van de Ven, and Degeest (1998). Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* 84, 1059–1068.
66. Decho, A.W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* 20, 1257–1273.
67. Degeest, B., and de Vuyst, L. (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2863–2870.
68. Degeest, B., and de Vuyst, L. (2000). Correlation of activities of the enzymes alpha-phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3519–3527.
69. D’Haeze, W., Glushka, J., De Rycke, R., Holsters, M., and Carlson, R.W. (2004). Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.* 52, 485–500.
70. Doherty, D., Leigh, J.A., Glazebrook, J., and Walker, G.C. (1988). *Rhizobium meliloti* mutants that overproduce the *R. meliloti* acidic calcofluor-binding exopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 170, 4249–4256.
71. Domon B, & Costello CE. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.* 5, 397–409.
72. Doublier J.L. (1986). Caractérisation expérimentale des propriétés fonctionnelles des polysaccharides par des méthodes rhéologiques. In *Propriétés Fonctionnelles Des Polysaccharides*, M. Colonna et M. Thibault, ed. (Paris: APRIA), pp. 47–77.

73. Drouillard, S., Jeacomine, I., Buon, L., Boisset, C., Courtois, A., Thollas, B., Morvan, P.-Y., Vallée, R., and Helbert, W. (2015). Structure of an Amino Acid-Decorated Exopolysaccharide Secreted by a *Vibrio alginolyticus* Strain. *Mar Drugs* 13, 6723–6739.
74. DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
75. Dudman, W.F. (1964). Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. *J. Bacteriol.* 88, 640–645.
76. Dudman, W. F. (1977). The role of surface polysaccharides in natural environments. In: *Surface Carbohydrates of Prokaryotic Cell*, I. W. Sutherland, ed. (Academic Press, New York), pp. 357–414.
77. Duguid, J.P., and Wilkinson, J.F. (1953). The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 9, 174–189.
78. Duta, F. P., de França, F. P., de Almeida Lopes, M., L. (2006). Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. *Elect. J. of Biotechnol.* 9, 391–399.
79. Duus, J., Gotfredsen, C.H., and Bock, K. (2000). Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: modern methods and limitations. *Chem. Rev.* 100, 4589–4614.
80. Faber, E.J., van Haaster, D.J., Kamerling, J.P., and Vliegthart, J.F.G. (2002). Characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 8S containing an open chain nononic acid. *European Journal of Biochemistry* 269, 5590–5598.
81. Farrés, J., Caminal, G., and López-Santín, J. (1997). Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 522–527.
82. Feng, L., Li, X., Du, G., and Chen, J. (2009). Characterization and fouling properties of exopolysaccharide produced by *Klebsiella oxytoca*. *Bioresour. Technol.* 100, 3387–3394.
83. Fialho, A.M., Moreira, L.M., Granja, A.T., Popescu, A.O., Hoffmann, K., and Sá-Correia, I. (2008). Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 889–900.
84. Fischer, W., Schmidt, M.A., Jann, B., and Jann, K. (1982). Structure of the *Escherichia coli* K2 capsular antigen. Stereochemical configuration of the glycerophosphate and distribution of galactopyranosyl and galactofuranosyl residues. *Biochemistry* 21, 1279–1284.
85. Fisher, M.L., Allen, R., Luo, Y., and Curtiss, R. (2013). Export of extracellular polysaccharides modulates adherence of the *Cyanobacterium synechocystis*. *PLoS ONE* 8, e74514.
86. Flemming, H.C. (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 86, 251–259.
87. Flemming, H.C., and Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) -Part II: Technical aspects. *Water Sci. Technol.* 43, 9–16.
88. Flemming, H.C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633.
89. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
90. Foods, T.I.C. on M.S. for (1980). Meats and Meat Products. In *Microbial Ecology of Foods*, (Academic Press), pp. 333–409.
91. Fouissac E., Milas M., and Rinaudo M. (1993). Shear-rate, concentration, molecular weight, and temperature viscosity dependences of hyaluronate, a wormlike polyelectrolyte. *Macromolecules* 26, 6945–6951.
92. França M.B., Panek A.D. and Eleutherio E.C. (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. and Phys. Part A* 146, 621–631.

93. Freeze, H.H., and Elbein, A.D. (2009). Glycosylation precursors. In: Essentials of Glycobiology, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
94. Freiburger, F., Claus, H., Günzel, A., Oltmann-Norden, I., Vionnet, J., Mühlenhoff, M., Vogel, U., Vann, W.F., Gerardy-Schahn, R., and Stummeyer, K. (2007). Biochemical characterization of a *Neisseria meningitidis* polysialyltransferase reveals novel functional motifs in bacterial sialyltransferases. Mol. Microbiol. 65, 1258–1275.
95. Freitas, F., Alves, V.D., and Reis, M.A.M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol. 29, 388–398.
96. Galindo, E., and Salcedo, G. (1996). Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. Enzyme and Microbial Technology 19, 145–149.
97. Gamar-Nourani, L., Blondeau, K., and Simonet, J.M. (1998). Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol. 85, 664–672.
98. Garcia-Garibay, M., and Marshall, V.M.E. (1991). Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Appl. Bacteriol. 70, 325–328.
99. García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A., and Gómez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnol. Adv. 18, 549–579.
100. Garcia-Pichel, F., and Pringault, O. (2001). Microbiology: Cyanobacteria track water in desert soils. Nature 413, 380–381.
101. Garleb, K.A., Bourquin, L.D., and Fahey, G.C. (1989). Neutral monosaccharide composition of various fibrous substrates: a comparison of hydrolytic procedures and use of anion-exchange high-performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection of monosaccharides. J. Agric. Food Chem. 37, 1287–1293.
102. Garnett, J.A., and Matthews, S. (2012). Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. Curr. Protein Pept. Sci. 13, 739–755.
103. Garegg, P. J., Jansson, P. E., Lindberg, B., Lindh, F., Lönngren, J., Kvarnström, I., and Nimmich, W. (1980). Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. Carbohydrate Research, 78(1), 127–132.
104. Geesey, G.G., and White, D.C. (1990). Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. Annu. Rev. Microbiol. 44, 579–602.
105. Gerwig, G.J., Kamerling, J.P., and Vliegthart, J.F.G. (1978). Determination of the d and l configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary g.l.c. Carbohydr. Res. 62, 349–357.
106. Giavasis, I., Harvey, L.M., and McNeil, B. (2000). Gellan gum. Crit. Rev. Biotechnol. 20, 177–211.
107. Gilbert, P., Das, J., and Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. Adv. Dent. Res. 11, 160–167.
108. Gillet, P., Barrat, J.A., Heulin, T., Achouak, W., Lesourd, M., Guyot, F., and Benzerara, K. (2000). Bacteria in the Tatahouine meteorite: nanometric-scale life in rocks. Earth and Planetary Science Letters 175, 161–167.
109. Glushka, J. N., Terrell, M., York, W. S., O'Neill, M. A., Gucwa, A., Darvill, A. G., ... and Prestegard, J. H. (2003). Primary structure of the 2-O-methyl- α -L-fucose-containing side chain of the pectic polysaccharide, rhamnogalacturonan II. Carbohydrate research, 338(4), 341–352
110. Goeij S. de, Kok W.Th. (2013). Quantitative analysis methods for sugars. Literature Thesis, MSc Chemistry. Universiteit van Amsterdam.
111. Gomis, D. B., Tamayo, D. M., and Alonso, J. M. (2001). Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 436, 173–180.

112. Gommeaux, M., Barakat, M., Lesourd, M., Thiéry, J., and Heulin, T. (2005). A morphological transition in the pleomorphic bacterium *Ramlibacter tataouinensis* TTB310. *Research in Microbiology* 156, 1026–1030.
113. Goncalves, M.D.S., Delattre, C., Balestrino, D., Charbonnel, N., Elboutachfai, R., Wadouachi, A., Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., and Forestier, C. (2014). Anti-biofilm activity: A function of *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide. *PLoS ONE* 9, e99995.
114. Gorin, P. A., and Iacomini, M. (1984). Polysaccharides of the lichens *Cetraria islandica* and *Ramalina usnea*. *Carbohydrate Research*, 128(1), 119–132.
115. Gorret, N., Maubois, J.L., Engasser, J.M., and Ghoul, M. (2001). Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidipropionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *J. Appl. Microbiol.* 90, 788–796.
116. Górka-Frączek, S., Sandström, C., Kenne, L., Rybka, J., Strus, M., Heczko, P., and Gamian, A. (2011). Structural studies of the exopolysaccharide consisting of a nonasaccharide repeating unit isolated from *Lactobacillus rhamnosus* KL37B. *Carbohydr. Res.* 346, 2926–2932.
117. Goyal K., Walton L.J., Browne J.A., Burnell A.M. and Tunnacliffe A. (2005) Molecular anhydrobiosis: identifying molecules implicated in vertebrate anhydrobiosis. *Integr. Comp. Biol.* 45, 702–709.
118. Gravanis, G., Milas, M., Rinaudo, M., and Clarke-Sturman, A.J. (1990). Rheological behaviour of a succinoglycan polysaccharide in dilute and semi-dilute solutions. *Int. J. Biol. Macromol.* 12, 201–206.
119. Grobbs, G.J., Smith, M.R., Sikkema, J., and Bont, J.A.M. de (1996). Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 279–284.
120. Gromska, W., and Mayer, H. (1976). The linkage of lysine in the O-specific chains of *Proteus mirabilis* 1959. *The FEBS Journal*, 62(2), 391–399.
121. Guidi, M.C., Mirri, C., Fratini, E., Licursi, V., Negri, R., Marcelli, A., and Amendola, R. (2012). In vivo skin leptin modulation after 14 MeV neutron irradiation: a molecular and FT-IR spectroscopic study. *Anal Bioanal Chem* 404, 1317–1326.
122. Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., and Sinityn, A.P. (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *Int. J. Anal. Chem.* 2011, 283658.
123. Hakomori, S. (1964). A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* 55, 205–208.
124. Hao, L., Xing, X., Li, Z., Zhang, J., Sun, J., Jia, S., Qiao, C., and Wu, T. (2010). Optimization of effect factors for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Schizophyllum commune*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 621–631.
125. Harvey, David J. (2005). Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 1. Use of nitrate and other anionic adducts for the production of negative ion electrospray spectra from N-linked carbohydrates. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 16(5,) 622–630.
126. Hashimoto, K., Tokimatsu, T., Kawano, S., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Goto, S., and Kanehisa, M. (2009). Comprehensive analysis of glycosyltransferases in eukaryotic genomes for structural and functional characterization of glycans. *Carbohydr. Res.* 344, 881–887.
127. Hashimoto, A., Shimono, K., Horikawa, Y., Ichikawa, T., Wada, M., Imai, T., and Sugiyama, J. (2011). Extraction of cellulose-synthesizing activity of *Gluconacetobacter xylinus* by alkylmaltoside. *Carbohydr. Res.* 346, 2760–2768.
128. Haverkamp, J., Van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J.F.G., Pfeil, R., and Schauer, R. (1982). High-resolution ¹H-NMR spectroscopy of free and glycosidically linked O-acetylated sialic acids. *Eur. J. Biochem.* 122: 305–311.

129. Hay, I.D., Rehman, Z.U., Moradali, M.F., Wang, Y., and Rehm, B.H.A. (2013). Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.* 6, 637–650.
130. He, Y., Ye, M., Du, Z., Wang, H., Wu, Y., and Yang, L. (2014). Purification, characterization and promoting effect on wound healing of an exopolysaccharide from *Lachnum* YM405. *Carbohydr Polym* 105, 169–176.
131. Hebbar, K.P., Gueniot, B., Heyraud, A., Colin-Morel, P., Heulin, T., Balandreau, J., and Rinaudo, M. (1992). Characterization of exopolysaccharides produced by rhizobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 248–253.
132. Heulin, T., Barakat, M., Christen, R., Lesourd, M., Sutra, L., De Luca, G., and Achouak, W. (2003). *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *Ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 589–594.
133. Heulin, T., Luca, G.D., Barakat, M., Groot, A. de, Blanchard, L., Ortet, P., and Achouak, W. (2012). Bacterial adaptation to hot and dry deserts. In *Adaption of Microbial Life to Environmental Extremes*, P.D.H. Stan-Lotter, and D.S. Fendrihan, eds. (Springer Vienna), pp. 69–85.
134. Hoebler, C., Barry, J.L., David, A., Delort-Laval, J. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 360-365
135. Hon, D.N.-S., and Shiraishi, N. (2000). *Wood and Cellulosic Chemistry*, Second Edition, Revised, and Expanded (CRC Press).
136. Hu, Y., and Walker, S. (2002). Remarkable structural similarities between diverse glycosyltransferases. *Chem. Biol.* 9, 1287–1296.
137. Hubbard, C., McNamara, J.T., Azumaya, C., Patel, M.S., and Zimmer, J. (2012). The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J. Mol. Biol.* 418, 21–31.
138. Hussain, F., Khan, I.U., Habib, N., Xian, W.-D., Hozzein, W.N., Zhang, Z.-D., Zhi, X.-Y., and Li, W.-J. (2016). *Deinococcus saudiensis* sp. nov., isolated from desert. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
139. Hvorup, R.N., Winnen, B., Chang, A.B., Jiang, Y., Zhou, X.-F., and Saier, M.H. (2003). The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *Eur. J. of Biochem.* 270, 799–813.
140. Ionescu, M., and Belkin, S. (2009). Overproduction of Exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 rpoS Mutant in Response to Osmotic Stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 483–492.
141. Islam, S.T., and Lam, J.S. (2013). Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. *Environ. Microbiol.* 15, 1001–1015.
142. Islam, S.T., and Lam, J.S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Can. J. Microbiol.* 60, 697–716.
143. Ismail, B., and Nampoothiri, K.M. (2010). Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Arch. Microbiol.* 192, 1049–1057.
144. Jain, S., and Ohman, D.E. (1998). Deletion of *algK* in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* blocks alginate polymer formation and results in uronic acid secretion. *J. Bacteriol.* 180, 634–641.
145. Jann, B., and Jann, K. (1990). Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150, 19–42.
146. Jann, K., and Jann, B. (1983). The K antigens of *Escherichia coli*. *Prog Allergy* 33, 53–79.
147. Jansson, P. E., Stenutz, R., and Widmalm, G. (2006). Sequence determination of oligosaccharides and regular polysaccharides using NMR spectroscopy and a novel Web-based version of the computer program CASPER. *Carbohydr. Res.* 341, 1003–1010.

148. Jiménez-Barbero, J., Peters, T., and Wiley InterScience (Online service) (2003). NMR spectroscopy of glycoconjugates (Weinheim: Wiley-VCH).
149. Jung, J.-H., Choi, N.-Y., and Lee, S.-Y. (2013). Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiol.* **34**, 70–80.
150. Junge, K., Eicken, H., and Deming, J.W. (2004). Bacterial activity at -2 to -20 degrees C in Arctic wintertime sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 550–557.
151. Jung, J.-H., Choi, N.-Y., and Lee, S.-Y. (2013). Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. *Food Microbiol.* **34**, 70–80.
152. Kaci, Y., Heyraud, A., Barakat, M., and Heulin, T. (2005). Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Res. Microbiol.* **156**, 522–531.
153. Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J.S., Reuhs, B.L., Lion, L.W., and Ghiorse, W.C. (2001). Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology* **3**, 774–784.
154. Kanmani, P., Satish kumar, R., Yuvaraj, N., Paari, K.A., Pattukumar, V., and Arul, V. (2011). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* PI80 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour. Technol.* **102**, 4827–4833.
155. Kazy, S.K., Sar, P., Singh, S.P., Sen, A.K., and D'Souza, S.F. (2002). Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**, 583–588.
156. Keiski, C.-L., Harwich, M., Jain, S., Neculai, A.M., Yip, P., Robinson, H., Whitney, J.C., Riley, L., Burrows, L.L., Ohman, D.E., et al. (2010). AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure* **18**, 265–273.
157. Kenne, L., and Lindberg, B. (1983). Bacterial polysaccharides. In: *The Polysaccharides*, Aspinall, G. O., ed. (Academic Press), pp. 287–363.
158. Kim, S.H., Ramaswamy, S., and Downard, J. (1999). Regulated exopolysaccharide production in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **181**, 1496–1507.
159. Kojic, M., Vujcic, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J., and Topisirovic, L. (1992). Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4086–4088.
160. Kralj, S., van Geel-Schutten, G.H., Dondorff, M.M.G., Kirsanovs, S., van der Maarel, M.J.E.C., and Dijkhuizen, L. (2004). Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology*. **150**, 3681–3690.
161. Krämer, R. (2010). Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem Record* **10**, 217–229.
162. Küçük, Ç., and Kivanç, M. (2009). Extracellular polysaccharide production by *Rhizobium ciceri* from Turkey. *Ann. Microbiol.* **59**, 141–144.
163. Kumar, A.S., Mody, K., and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides--a perception. *J. Basic Microbiol.* **47**, 103–117.
164. Lahaye, M. and Ray, B. (1996). Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta)—NMR analysis of ulvan oligosaccharides. *Carbohydrate research*, **283**, 161–173.
165. Lairson, L.L., Henrissat, B., Davies, G.J., and Withers, S.G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 521–555.
166. Lapasin, R., and Prich, S. (1995). The polysaccharides: sources and structures. In *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications*, (Springer US), pp. 1–133.

167. Lapasin, R., and Prich, S. (1999). Rheology of industrial polysaccharides: Theory and Applications (Springer).
168. Larue, K., Ford, R.C., Willis, L.M., and Whitfield, C. (2011). Functional and structural characterization of polysaccharide co-polymerase proteins required for polymer export in ATP-binding cassette transporter-dependent capsule biosynthesis pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 16658–16668.
169. Lee, H.S., Park, S.H., Lee, J.H., and Lee, H.K. (2001). Effect of aeration rates on production of extracellular polysaccharide, EPS-R, by marine bacterium *Hahella chejuensis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6, 359–362.
170. Leigh, J.A., and Walker, G.C. (1994). Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* 10, 63–67.
171. Leontin, K., Lindberg, B., and Lönnngren, J. (1978). Assignment of absolute configuration of sugars by g.l.c. of their acetylated glycosides formed from chiral alcohols. *Carbohydr. Res.* 62, 359–362.
172. Li, J., Wang, Z., & Altman, E. (2005). In-source fragmentation and analysis of polysaccharides by capillary electrophoresis/mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19(10), 1305–1314.
173. Li, Z., Gao, Y., Nakanishi, H., Gao, X., and Cai, L. (2013). Biosynthesis of rare hexoses using microorganisms and related enzymes. *Beilstein J. Org. Chem.* 9, 2434–2445.
174. Lin, Y., Liu, J., Hu, Y., Song, X., and Zhao, Y. (2012). An antioxidant exopolysaccharide devoid of pro-oxidant activity produced by the soil bacterium *Bordetella sp.* B4. *Bioresour. Technol.* 124, 245–251.
175. Lindberg, B., Lönnngren, J., and Svensson, S. (1975). Specific degradation of polysaccharides. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, R.S.T. and D. Horton, ed. (Academic Press), pp. 185–240.
176. Lipkind, G.M., Shashkov, A.S., Knirel, Y.A., Vinogradov, E.V., and Kochetkov, N.K. (1988). A computer-assisted structural analysis of regular polysaccharides on the basis of ^{13}C -NMR. data. *Carbohydr. Res.* 175, 59–75.
177. Liu, C., Lu, J., Lu, L., Liu, Y., Wang, F., and Xiao, M. (2010). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Biores. Technol.* 101, 5528–5533.
178. Liu, S.-B., Chen, X.-L., He, H.-L., Zhang, X.-Y., Xie, B.-B., Yu, Y., Chen, B., Zhou, B.-C., and Zhang, Y.-Z. (2013). Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas sp.* strain SM20310. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 224–230.
179. Liu, X., Ai, N., Zhang, H., Lu, M., Ji, D., Yu, F., and Ji, J. (2012). Quantification of glucose, xylose, arabinose, furfural, and HMF in corn cob hydrolysate by HPLC-PDA–ELSD. *Carbohydr. Res.* 353, 111–114.
180. Liu, Y.-S., and Wu, J.-Y. (2012). Effects of Tween 80 and pH on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 623–628.
181. Lo, R.Y., McKerral, L.J., Hills, T.L., and Kostrzynska, M. (2001). Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect. Immun.* 69, 4458–4464.
182. Lodhi-Hassan, A., Heulin, T., Milas, M., Heyraud, A., Achouak, W., Berge, O., Deline, L., Sanhaji, G., and Bresin, A. (2006). Nouveau polysaccharide, son procédé de préparation et ses utilisations notamment dans le domaine cosmétique. French patent no. 06/08840, 9 October 2006.
183. Lopes, J.F., and Gaspar, E.M.S.M. (2008). Simultaneous chromatographic separation of enantiomers, anomers and structural isomers of some biologically relevant monosaccharides. *J. Chromatogr. A* 1188, 34–42.

184. Low, D., Ahlgren, J.A., Horne, D., McMahon, D.J., Oberg, C.J., and Broadbent, J.R. (1998). Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2147–2151.
185. Lundborg, M., and Widmalm, G. (2011). Structural analysis of glycans by NMR chemical shift prediction. *Anal. Chem.* 83, 1514–1517.
186. Lundqvist, L. (2015). Structural and interaction studies of polysaccharides by NMR spectroscopy, Vol. 2015, No. 17).
187. Lütteke, T., Bohne-Lang, A., Loss, A., Goetz, T., Frank, M., and von der Lieth, C.W. (2006). GLYCOSCIENCES.de: an Internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology* 16, 71–81.
188. Lv, Y., Yang, X., Zhao, Y., Ruan, Y., Yang, Y., and Wang, Z. (2009). Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from *Gynostemma pentaphyllum* by HPLC with indirect UV detection. *Food Chem.* 112, 742–746.
189. Ma, X.-K., Zhang, H., and Fam, H. (2013). Influence of rutin, FeSO₄, Tween 80, aspartate and complex vitamins on synthesis of fungal exopolysaccharide. *Carbohydr Polym.* 92, 1188–1196.
190. Macedo, M.G., Lacroix, C., and Champagne, C.P. (2002). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. *Biotechnol. Progress* 18, 167–173.
191. Manca de Nadra, M.C., Strasser de Saad, A.M., Pesce de Ruiz Holgado, A., and Oliver, G. (1985). Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft (Germany, F.R.)* 40, 409–411.
192. Manzanera, M., Vilchez, S., and Tunnacliffe, A. (2004). High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters* 233, 347–352.
193. Marchal, I., Golfier, G., Dugas, O., and Majed, M. (2003). Bioinformatics in glycobiology. *Biochimie* 85, 75–81.
194. Margaritis, A., and Pace, G. W. (1985). Microbial polysaccharides. In *Comprehensive Biotechnology*, (Oxford: Pergamon Press), pp. 1005–1044.
195. Marshall, A.G. (2000). Milestones in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development. *Int. J. Mass Spectrom.* 200, 331–356.
196. Matsuyama, H., Sasaki, R., Kawasaki, K., and Yumoto, I. (1999). Production of a novel exopolysaccharide by *Rahnella aquatilis*. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 180–183.
197. McGrath, B.C., and Osborn, M.J. (1991). Localization of the terminal steps of O-antigen synthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 173, 649–654.
198. McIntosh, M., Stone, B.A., and Stanisich, V.A. (2005). Curdlan and other bacterial (1→3)-beta-D-glucans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68, 163–173.
199. McNulty, C., Thompson, J., Barrett, B., Lord, L., Andersen, C., and Roberts, I.S. (2006). The cell surface expression of group 2 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*: the role of KpsD, RhsA and a multi-protein complex at the pole of the cell. *Mol. Microbiol.* 59, 907–922.
200. Michalski, J.C. (1986). Analysis of monosaccharides by GLC and by HPLC. In *Methods on Glycoconjugates*, Verbert, A., ed. (Chur, Switzerland: Harwood Academic Press), pp. 31–38.
201. Miller, K.J., and Wood, J.M. (1996). Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 101–36.
202. Mitry, R.R., Sarraf, C.E., Havlík, R., and Habib, N.A. (2000). Detection of adenovirus and initiation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells after Ad-p53 treatment. *Hepatology* 31, 885–889.
203. Mittelman, M.W., and Geesey, G.G. (1985). Copper-binding characteristics of exopolymers from a freshwater-sediment bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 846–851.
204. Monchois, V., Willemot, R.M., and Monsan, P. (1999). Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 131–151.

205. Montero-Calasanz, M. del C., Göker, M., Pötter, G., Rohde, M., Spröer, C., Schumann, P., Gorbushina, A.A., and Klenk, H.P. (2013). *Geodermatophilus normandii* sp. nov., isolated from Saharan desert sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3437–3443.
206. Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., and Scheppler, N. (1963). Methods of study of the structure of glycoproteins. *J. Pharm. Belg.* 18, 529–546.
207. Moorhouse R. (1987). Structure/property relationships of a family of microbial polysaccharides. In *Industrial Polysaccharides : Genetic Engineering, Structure/property Relations and Applications*, M. Yalpani, ed. (Amsterdam: Elsevier), pp. 187–206.
208. Morin, A. (1998). Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production and recovery of microbial polysaccharides. In: *Polysaccharides – Structural Diversity and Functional Versatility*, Dumitriu, S., ed. (New York: Marcel Dekker Inc. Publication), pp. 275–296.
209. Morona, R., Purins, L., Tocilj, A., Matte, A., and Cygler, M. (2009). Sequence-structure relationships in polysaccharide co-polymerase (PCP) proteins. *Trends Biochem. Sci.* 34, 78–84.
210. Morris, E. R. (1986). Molecular origin of hydrocolloid functionality. In: *Gums and stabilisers for the food industry 3*, G. O. Phillips, Wedlock & P. A. WiBiams, ed. (Great Britain: Elsevier Applied Science Publishers Ltd.), pp. 3–16.
211. Morris, E. R. (1991). Pourable gels : polysaccharides that stabilise emulsions and dispersions by physical trapping. *Internat. Food Ingredients* 1, 32–37.
212. Morris, E. R. (1995). Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, A. M. Stephen, ed. (New York: Marcel Dekker), pp. 517–546.
213. Morris, V.J. (1990). Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems. *Food Biotechnol.* 4, 45–57.
214. Morris, V.J., and Wilde, P.J. (1997). Interactions of food biopolymers. *Curr. Opin Coll. Interface Sci.* 2, 567–72.
215. Moxon, E.R., and Kroll, J.S. (1990). The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 150, 65–85.
216. Mozzi, F., Savoy De Giori, G. S., Oliver, G., and Font De Valdez, G. (1995a). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. I: Influence of salts. *Milchwissenschaft.* 50, 186–188.
217. Mozzi, F., Savoy De Giori, G. S., Oliver, G., and Font De Valdez, G. (1995b). Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei*. II: Influence of carbon source. *Milchwissenschaft.* 50, 307–309.
218. Mulford, C.A., and Osborn, M.J. (1983). An intermediate step in translocation of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 1159–1163.
219. Murofushi Kanji, Homma Taira, Nagura Shigehiro, and Armentrout Richard W (1997). Process for preparation of purified xanthan gum – US Patent. N° 5595892
220. Myszka, K., and Czaczyk, K. (2009). Characterization of adhesive exopolysaccharide (EPS) produced by *Pseudomonas aeruginosa* under starvation conditions. *Curr. Microbiol.* 58, 541–546.
221. Nakao, Y. (1997). Properties and food applications of curdlan. *Agro. Food Ind. HiTech* 8, 12–15.
222. Nedwell, null (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30, 101–111.
223. Neszmélyi, A., Kosma, P., Christian, R., Schulz, G., & Unger, F. M. (1985). Empirical ¹³C-NMR-correlations between the *Escherichia coli* K 13 and LP 1092 capsular polysaccharides and model oligosaccharides containing d-ribose and 3-deoxy-d-manno-2-octulosonic acid. *Carbohydrate research*, 139, 13–22.
224. Nichols, C.A.M., Guezennec, J., and Bowman, J.P. (2005a). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Mar. Biotechnol.* 7, 253–271.

225. Nichols, C.M., Lardière, S.G., Bowman, J.P., Nichols, P.D., A E Gibson, J., and Guézennec, J. (2005b). Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb. Ecol.* 49, 578–589.
226. Nwodo, U.U., Green, E., and Okoh, A.I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14002–14015.
227. Ogawa, K., Yamaura, M. and Maruyama, I. (1997). Isolation and identification of 2-O-methyl-L-rhamnose and 3-O-methyl-L-rhamnose as constituents of an acidic polysaccharide of *Chlorella vulgaris*. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 61(3), 539-540.
228. Orgambide, G. G., Philip-Hollingsworth, S., Dazzo, F. B., Tola, E., Squartini, A., Nuti, M. P., ... and Hollingsworth, R. I. (1996). Glycoconjugate and lipid components of *Rhizobium edysari* IS123, a root-nodule symbiont of the stress-tolerant legume *Hedysarum coronarium*. *Canadian journal of microbiology*, 42(4), 340-345.
229. Ozturk, S., and Aslim, B. (2010). Modification of exopolysaccharide composition and production by three cyanobacterial isolates under salt stress. *Environ. Sci. Pollut. Res Int.* 17, 595–602.
230. Parikh, A., and Madamwar, D. (2006). Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology* 97, 1822–1827.
231. Patel, A., and Prajapati, J.B., (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Adv. Dairy Res.* 1:107.
232. Patiny, L., and Borel A. (2013). ChemCalc: a building block for tomorrow's chemical infrastructure. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 53 (5), 1223-1228.
233. Patton, J.T. (1962). Thickening agent and process for producing the same. US Pat. 5,595,892.
234. Patil, S.V., Salunkhe, R.B., Patil, C.D., Patil, D.M., and Salunke, B.K. (2010). Bioflocculant exopolysaccharide production by *Azotobacter indicus* using flower extract of *Madhuca latifolia* L. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 1095–1108.
235. Patil, K.P., Patil, D.K., Chaudhari, B.L., and Chincholkar, S.B. (2011). Production of hyaluronic acid from *Streptococcus zooepidemicus* MTCC 3523 and its wound healing activity. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 286–288.
236. Paul, F., Morin, A., and Monsan, P. (1986). Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotech. Adv.* 4, 245–259.
237. Pazzani, C., Rosenow, C., Boulnois, G.J., Bronner, D., Jann, K., and Roberts, I.S. (1993). Molecular analysis of region 1 of the *Escherichia coli* K5 antigen gene cluster: a region encoding proteins involved in cell surface expression of capsular polysaccharide. *J. Bacteriol.* 175, 5978–5983.
238. Pérez-Victoria, I., Zafra, A., & Morales, J. C. (2008). Positive-ion ESI mass spectrometry of regioisomeric nonreducing oligosaccharide fatty acid monoesters: In-source fragmentation of sodium adducts. *Journal of mass spectrometry*, 43(5), 633-638.
239. Peterson, D.C., Arakere, G., Vionnet, J., McCarthy, P.C., and Vann, W.F. (2011). Characterization and acceptor preference of a soluble meningococcal group C polysialyltransferase. *J. Bacteriol.* 193, 1576–1582.
240. Petit, C., Grill, J.P., Maazouzi, N., and Marczak, R. (1991). Regulation of polysaccharide formation by *Streptococcus thermophilus* in batch and fed-batch cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 36, 216–221.
241. Petry, S., Furlan, S., Crepeau, M.J., Cerning, J., and Desmazeaud, M. (2000). Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3427–3431.
242. Philippis, R.D., Sili, C., and Vincenzini, M. (1996). Response of an exopolysaccharide-producing heterocystous cyanobacterium to changes in metabolic carbon flux. *J. Appl. Phycol.* 8, 275–281.
243. Poli, A., Anzelmo, G., and Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar. Drugs* 8, 1779–1802.

244. Porsch, E.A., Kehl-Fie, T.E., and St Geme, J.W. (2012). Modulation of *Kingella kingae* adherence to human epithelial cells by type IV Pili, capsule, and a novel trimeric autotransporter. *MBio* 3.
245. Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58, 755–805.
246. Potts M., Slaughter S.M., Hunneke F., Garst J.F. and Helm R.F. (2005). Desiccation Tolerance of Prokaryotes. Application of Principles to Human Cells. *Integr. Comp. Biol.* 45, 800–809
247. Qiang, L., Yumei, L., Sheng, H., Yingzi, L., Dongxue, S., Dake, H., Jiajia, W., Yanhong, Q., and Yuxia, Z. (2013). Optimization of fermentation conditions and properties of an exopolysaccharide from *Klebsiella* sp. H-207 and application in adsorption of hexavalent chromium. *PLoS ONE* 8, e53542.
248. Quelas, J.I., López-García, S.L., Casabuono, A., Althabegoiti, M.J., Mongiardini, E.J., Pérez-Giménez, J., Couto, A., and Lodeiro, A.R. (2006). Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Arch. Microbiol.* 186, 119–128.
249. Racaityte, K., Kiessig, S., and Kálmán, F. (2005). Application of capillary zone electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography in the biopharmaceutical industry for the quantitative analysis of the monosaccharides released from a highly glycosylated therapeutic protein. *J. Chromatogr. A* 1079, 354–365.
250. Raetz, C.R.H., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635–700.
251. Rahn, A., Drummelsmith, J., and Whitfield, C. (1999). Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 181, 2307–2313.
252. Ramos-Vera, W.H., Labonté, V., Weiss, M., Pauly, J., and Fuchs, G. (2010). Regulation of autotrophic CO₂ fixation in the archaeon *Thermoproteus neutrophilus*. *J. Bacteriol.* 192, 5329–5340.
253. Ravenscroft, N., Cescutti, P., Gavini, M., Stefanetti, G., MacLennan, C. A., Martin, L. B., and Micoli, F. (2015). Structural analysis of the O-acetylated O-polysaccharide isolated from *Salmonella paratyphi* A and used for vaccine preparation. *Carbohydrate research*, 404, 108–116.
254. Ray, P., Pal, S., and Paul, A.K. (1998). Exopolysaccharide production by some rhizobium strain in culture. *Hindustan Antibiot Bull* 40, 42–46.
255. Read, R.R., and Costerton, J.W. (1987). Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* 33, 1080–1090.
256. Reddy, G.S.N., and Garcia-Pichel, F. (2005). *Dyadobacter crusticola* sp. nov., from biological soil crusts in the Colorado Plateau, USA, and an emended description of the genus *Dyadobacter* (Chelium and Triplett 2000). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1295–1299.
257. Reddy, G.S.N., and Garcia-Pichel, F. (2009). Description of *Patulibacter americanus* sp. nov., isolated from biological soil crusts, emended description of the genus *Patulibacter* Takahashi et al. 2006 and proposal of *Solirubrobacterales* ord. nov. and *Thermoleophilales* ord. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 87–94.
258. Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D., Raetz, C.R., et al. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol.* 4, 495–503.
259. Rehm, B. (2009). Microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives (Wymondham: Caister Academic).
260. Rehm, B.H.A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 578–592.
261. Rehm, B.H., and Valla, S. (1997). Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 281–288.

262. Reid, A.N., and Whitfield, C. (2005). Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 187, 5470–5481.
263. Reisdorf, C., Abergel, D., Bontems, F., Lallemand, J. Y., Decottignies, J. P., and Spik, G. (1994). Proton resonance assignments and secondary structure of bovine angiogenin. *The FEBS Journal*, 224(3), 811-822.
264. Rigg, G.P., Barrett, B., and Roberts, I.S. (1998). The localization of KpsC, S and T, and KfiA, C and D proteins involved in the biosynthesis of the *Escherichia coli* K5 capsular polysaccharide: evidence for a membrane-bound complex. *Microbiology* 144, 2905–2914.
265. Roberts, I.S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 285–315.
266. Roberts, I., Mountford, R., High, N., Bitter-Suermann, D., Jann, K., Timmis, K., and Boulnois, G. (1986). Molecular cloning and analysis of genes for production of K5, K7, K12, and K92 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 168, 1228–1233.
267. Roberts, I.S., Mountford, R., Hodge, R., Jann, K.B., and Boulnois, G.J. (1988). Common organization of gene clusters for production of different capsular polysaccharides (K antigens) in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170, 1305–1310.
268. Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 658–684.
- Roman, A. (1997). Etude structurale d'oligo et polysaccharides. Constitution d'une banque de données en spectrométrie de masse. DEA de Chimie moléculaire. Université Joseph Fourier Grenoble
269. Ross, P., Mayer, R., and Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.* 55, 35–58.
270. Ruas-Madiedo, P., and de los Reyes-Gavilán, C.G. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88, 843–856.
271. Sabri, S., Nielsen, L.K., and Vickers, C.E. (2013). Molecular Control of Sucrose Utilization in *Escherichia coli* W, an Efficient Sucrose-Utilizing Strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 478–487.
272. Sadasivan, L., and Neyra, C.A. (1985). Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* 163, 716–723.
273. Sainclivier, M. (1985). Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines. Salage, séchage, fumage, marinage, hydrolysats. In *L'industrie Alimentaire Halieutique*, (Rennes: Bulletin scientifique et technique de l'école nationale supérieure agronomique et du centre de recherches de Rennes), 2, pp. 6–162.
274. Santore, M.M., and Prud'homme, R.K. (1990). Rheology of a xanthan broth at low stresses and strains. *Carbohydr. Polym.* 12, 329–335.
275. Säwén, E., Huttunen, E., Zhang, X., Yang, Z., and Widmalm, G. (2010). Structural analysis of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* ST1 solely by NMR spectroscopy. *J. Biomol. NMR* 47, 125–134.
276. Schaechter, M., and Lederberg, J. (2004). The desk encyclopedia of microbiology (Amsterdam; Boston: Elsevier/Academic Press).
277. Schmid, J., Sieber, V., and Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* 6, 496.
278. Schnider-Keel, U., Lejbølle, K.B., Baehler, E., Haas, D., and Keel, C. (2001). The Sigma Factor AlgU (AlgT) Controls Exopolysaccharide Production and Tolerance towards Desiccation and Osmotic Stress in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5683–5693.
279. Seviour RJ, Schmid F, Campbell BC. (2010). Polysaccharides in Medicinal and Pharmaceutical Application. In: Popa V, ed. Shrewsbury: Smithers Rapra (in press), pp. 92.

280. Sharma, U., Bhandari, P., Kumar, N., and Singh, B. (2010). Simultaneous determination of ten sugars in *Tinospora cordifolia* by ultrasonic assisted extraction and LC-ELSD. *Chroma* 71, 633–638.
281. Shashkov, A. S., Toukach, F. V., Paramonov, N. A., Ziolkowski, A., Senchenkova, S. Y. N., Kaca, W., and Knirel, Y. A. (1996). Structures of new acidic O-specific polysaccharides of the bacterium *Proteus mirabilis* serogroups O26 and O30. *FEBS Letters*, 386(2-3), 247–251.
282. Sherwood, J.E., Vasse, J.M., Dazzo, F.B., and Truchet, G.L. (1984). Development and trifoliin A-binding ability of the capsule of *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.* 159, 145–152.
283. Silver, R.P., Aaronson, W., and Vann, W.F. (1987). Translocation of capsular polysaccharides in pathogenic strains of *Escherichia coli* requires a 60-kilodalton periplasmic protein. *J. Bacteriol.* 169, 5489–5495.
284. Silver, R.P., Prior, K., Nsahlai, C., and Wright, L.F. (2001). ABC transporters and the export of capsular polysaccharides from gram-negative bacteria. *Res. Microbiol.* 152, 357–364.
285. Sleator, R.D., and Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 49–71.
286. Smith, I.H., and Pace, G.W. (1982). Recovery of microbial polysaccharides. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 32, 119–129.
287. Socolofsky, M.D., and Wyss, O. (1962). Resistance of the *Azotobacter* cyst. *J. Bacteriol.* 84, 119–124.
288. Socrates, G. (1994). Infrared characteristic group frequencies: tables and charts (Chichester; New York: Wiley).
289. Song, Y.-R., Jeong, D.-Y., Cha, Y.-S., and Baik, S.-H. (2013). Exopolysaccharide produced by *Pediococcus acidilactici* M76 isolated from the Korean traditional rice wine, makgeolli. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 681–688.
290. Srikanth, R., Reddy, C.H.S.S.S., Siddartha, G., Ramaiah, M.J., and Uppuluri, K.B. (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydr. Polym.* 120, 102–114.
291. Starr, K.F., Porsch, E.A., Heiss, C., Black, I., Azadi, P., and Iii, J.W.S.G. (2013). Characterization of the *Kingella kingae* polysaccharide capsule and exopolysaccharide. *PLoS ONE* 8, e75409.
292. Steenbergen, S.M., and Vimr, E.R. (2008). Biosynthesis of the *Escherichia coli* K1 group 2 polysialic acid capsule occurs within a protected cytoplasmic compartment. *Mol. Microbiol.* 68, 1252–1267.
293. Stephen, A.M., Churms, S.C., and Vogt, D.C. (1990). Exudate gums. In: *Methods in Plant Biochemistry*, DEY, P.M. ed. (Academic Press), pp. 483–522.
294. Stepnaya, O.A., Ryazanova, L.P., Krupyanko, V.I., and Kulaev, I.S. (2001). Influence of acidic exopolysaccharide of *Xanthomonas campestris* IBPM 124 on the kinetic parameters of extracellular bacteriolytic enzymes. *Biochemistry Mosc.* 66, 662–666.
295. Strecker, G. (1993). Analyse structurale des chaînes glycaniques. *Biofutur* 46–52.
296. Strecker, G. (1995). NMR. In: *Methods on Glycoconjugates*, Verbert, A., ed. (Harwood: Academic Publishers), pp. 137–145.
297. Stülke, J., and Hillen, W. (1999). Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 195–201.
298. Su, C., Xu, X., Liu, D., Wu, M., Zeng, F., Zeng, M., Wei, W., Jiang, N., and Luo, X. (2013). Isolation and characterization of exopolysaccharide with immunomodulatory activity from fermentation broth of *Morchella conica*. *DARU J. Pharm. Sci.* 21, 5.
299. Sun, M., Li, W.-W., Mu, Z.-X., Wang, H.-L., Yu, H.-Q., Li, Y.-Y., and Harada, H. (2012). Selection of effective methods for extracting extracellular polymeric substances (EPSs) from *Bacillus megaterium* TF10. *Sep. Purif. Technol.* 95, 216–221.
300. Sun, H.-H., Mao, W.-J., Chen, Y., Guo, S.-D., Li, H.-Y., Qi, X.-H., Chen, Y.-L., and Xu, J. (2009). Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium sp.* F23-2. *Carbohydrate Polymers* 78, 117–124.

301. Sutherland, I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *In: Advances in Microbial Physiology*, A.H.R. and D.W. Tempest, ed. (Academic Press), pp. 143–213.
302. Sutherland, I.W. (1985). Biosynthesis and composition of gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 243–270.
303. Sutherland, I.W. (1990). *Biotechnology of microbial exopolysaccharides* (Cambridge: Cambridge University Press).
304. Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* 16, 41–46.
305. Sutherland, I. (2001a). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *In: Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 3–9.
306. Sutherland, I.W. (2001b). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int. Dairy J.* 11, 663–674.
307. Tago, Y., and Aida, K. (1977). Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 34, 308–314.
308. Takagi H. (2008). Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 8, 211–223.
309. Tang, J., Tung, M. a., and Zeng, Y. (1997). Gelling properties of gellan solutions containing monovalent and divalent cations. *J. Food Sci.* 62, 688–712.
310. Torres, C.A.V., Marques, R., Antunes, S., Alves, V.D., Sousa, I., Ramos, A.M., Oliveira, R., Freitas, F., and Reis, M.A.M. (2011). Kinetics of production and characterization of the fucose-containing exopolysaccharide from *Enterobacter* A47. *Journal of Biotechnology* 156, 261–267.
311. Troy, F.A., Frerman F.E., Heath E.C. (1971). The biosynthesis of capsular polysaccharide in *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 246, 118–33
312. Troy, F.A. (1992). Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* 2, 5–23.
313. Tvaroska, I., and Taravel, F.R. (1995). Carbon-proton coupling constants in the conformational analysis of sugar molecules. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 51, 15–61.
314. Tzeng, Y.-L., Datta, A.K., Strole, C.A., Lobritz, M.A., Carlson, R.W., and Stephens, D.S. (2005). Translocation and surface expression of lipidated serogroup B capsular polysaccharide in *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 73, 1491–1505.
315. Van den Berg, D., Robijn, G.W., Janssen, A.C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J.P., Vliegthart, J., Ledebor, A.M., and Verrips, C.T. (1995). Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2840–2844.
316. Van den Bulk, R. W., Zevenhuizen, L. P. T. M., Cordewener, J. H. G., and Dons, J. J. M. (1991). Characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 81(6), 619-623.
317. Van Hijum, S.A.F.T., Kralj, S., Ozimek, L.K., Dijkhuizen, L., and van Geel-Schutten, I.G.H. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 157–176.
318. VanDemark, P.J., and Batzing, B.L. (1987). *The microbes: an introduction to their nature and importance* (Benjamin/Cummings Publishing Company).
319. Vanhooren, P., and Vandamme, E.J. (1998). Biosynthesis, physiological role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *In: Recent Research Developments in Fermentation & Bioengineering*, 1, 253–300.
320. Vanhooren, P.T., and Vandamme, E.J. (1999). L-Fucose: occurrence, physiological role, chemical, enzymatic and microbial synthesis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 479–497.

321. Vermani, M. V., Kelkar, S. M., and Kamat, M.Y. (1997). Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**, 379–383.
322. Vimr, E.R., and Steenbergen, S.M. (2009). Early molecular-recognition events in the synthesis and export of group 2 capsular polysaccharides. *Microbiology (Reading, Engl.)* **155**, 9–15.
323. Vimr, E., Steenbergen, S., and Cieslewicz, M. (1995). Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. *J. Ind. Microbiol.* **15**, 352–360.
324. Vionnet, J., and Vann, W.F. (2007). Successive glycosyltransfer of sialic acid by *Escherichia coli* K92 polysialyltransferase in elongation of oligosialic acceptors. *Glycobiology* **17**, 735–743.
325. Virlogeux, I., Waxin, H., Ecobichon, C., and Popoff, M.Y. (1995). Role of the *viaB* locus in synthesis, transport and expression of *Salmonella typhi* Vi antigen. *Microbiology (Reading, Engl.)* **141**, 3039–3047.
326. Vliegenthart, J.F.G. (2006). Introduction to NMR Spectroscopy of Carbohydrates. In *NMR Spectroscopy and Computer Modeling of Carbohydrates*, J.F.G. Vliegenthart, and R.J. Woods, eds. (Washington, DC: American Chemical Society), pp. 1–19.
327. Vliegenthart, J.F.G., Dorland, L., and Halbeek, H. Van (1983). High-Resolution, ¹H-Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. In *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (Elsevier), pp. 209–374.
328. Walstra P. (1996). Dispersed systems : basic considerations. In *Food Chemistry*, O.R. Fennema, ed. (New York), pp. 95–155.
329. Weaver, P.F., Wall, J.D., and Gest, H. (1975). Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* **105**, 207–216.
330. Wetter, M., Goulding, D., Pickard, D., Kowarik, M., Waechter, C.J., Dougan, G., and Wacker, M. (2012). Molecular characterization of the *viaB* locus encoding the biosynthetic machinery for Vi capsule formation in *Salmonella typhi*. *PLoS ONE* **7**, e45609.
331. Whitfield, C. (1988). Bacterial extracellular polysaccharides. *Can. J. Microbiol.* **34**, 415–420.
332. Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 39–68.
333. Whitfield, C., and Roberts, I.S. (1999). Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **31**, 1307–1319.
334. Whitfield C, and Valvano M. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Adv. Microbiol. Phys.* **35**, 135–46
335. Whitney, J.C., Hay, I.D., Li, C., Eckford, P.D.W., Robinson, H., Amaya, M.F., Wood, L.F., Ohman, D.E., Bear, C.E., Rehm, B.H., et al. (2011). Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 13083–13088.
336. Whitney, J.C., and Howell, P.L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **21**, 63–72.
337. Wilkinson, J.F. (1958). The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriol. Rev.* **22**, 46–73.
338. Wilkinson, J.F., Dudman, W.F., and Aspinall, G.O. (1955). The extracellular polysaccharide of *Aerobacter aerogenes* A3 (S1) (*Klebsiella* type 54). *Biochem J* **59**, 446–451.
339. Williams, A.G., and Wimpenny, J.W.T. (1977). Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J. Gen. Microbiol.* **102**, 13–21.
340. Williams, D.H., and Fleming, I. (1995). Infrared Spectra. In *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, (Maidenhead, England: McGraw-Hill Companies), pp. 28–62.
341. Willis, L.M., Stupak, J., Richards, M.R., Lowary, T.L., Li, J., and Whitfield, C. (2013). Conserved glycolipid termini in capsular polysaccharides synthesized by ATP-binding cassette transporter-dependent pathways in Gram-negative pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 7868–7873.

342. Willis, L.M., and Whitfield, C. (2013a). Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydr. Res.* 378, 35–44.
343. Willis, L.M., and Whitfield, C. (2013b) KpsC and KpsS are retaining 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) transferases involved in synthesis of bacterial capsules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113 (51) E8238-E8246;
344. Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Robarts, R.D., and Caldwell, D.E. (1998). In situ characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microb. Ecol.* 35, 213–223.
345. Woodward, R., Yi, W., Li, L., Zhao, G., Eguchi, H., Sridhar, P.R., Guo, H., Song, J.K., Motari, E., Cai, L., et al. (2010). In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat. Chem. Biol.* 6, 418–423.
346. Yamanaka, T., Yamane, K., Mashimo, C., Nambu, T., Maruyama, H., Leung, K.P., and Fukushima, H. (2012). Exopolysaccharide productivity and biofilm phenotype on oral commensal bacteria as pathogenesis of chronic periodontitis. In *Pathogenesis and Treatment of Periodontitis*, Buduneli, Nurcan, ed. (InTech), pp. 19–32.
347. Yan, J.-C., Cui, C.-Y., Zhang, Y., and Chu, R.-H. (2003). Separation, purification and structural analysis of polysaccharides from Aloe. *Chemical Journal of Chinese Universities* 24.
348. Yang, L., and Zhang, L.-M. (2009). Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers* 76, 349–361.
349. Yang, Y., Peng, Q., Guo, Y., Han, Y., Xiao, H., and Zhou, Z. (2015). Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydr. Polym.* 133, 365–372.
350. Yang, S.-T. (2007). *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications* (Amsterdam; Boston: Elsevier).
351. Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 563–581.
352. Zayas, J.F. (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of Proteins in Food*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 6–75.
353. Zarei, M., Khezizadeh, M., Kazemipour, S., Hesami, G., and Bemani, E. (2012). Growth and Cell Morphology of *Listeria monocytogenes* as Affected by Various Concentrations of NaCl and KCl. *J. Appl. Bio. Sci.* 6, 94–104.
354. Zhang, B.B., and Cheung, P.C.K. (2011a). Use of stimulatory agents to enhance the production of bioactive exopolysaccharide from *Pleurotus tuber-regium* by submerged fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1210–1216.
355. Zhang, B.B., and Cheung, P.C.K. (2011b). A mechanistic study of the enhancing effect of Tween 80 on the mycelial growth and exopolysaccharide production by *Pleurotus tuber-regium*. *Bioresource Technology* 102, 8323–8326.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Effet de la concentration de NaCl et de KCl sur le ratio « kystes/bâtonnets »

La pression osmotique inadaptée peut avoir des conséquences sur la forme et le volume bactériens (Kramer, 2010). Nous avons constaté que le rajout de 10 g/L saccharose dans une culture de Rta dans TSB/10 au troisième jour de croissance n'influence pas la forme bactérienne. Cependant le NaCl à concentration 0,3 et 0,4 % altère la forme de Rta.

Les observations microscopiques ont démontré une modification dans la forme bactérienne et à partir de 0,3 % NaCl dans TSB/10 les bâtonnets se sont raccourcis deux à trois fois par rapport au contrôle contenant 0,05 % NaCl (Fig. 73A et B).

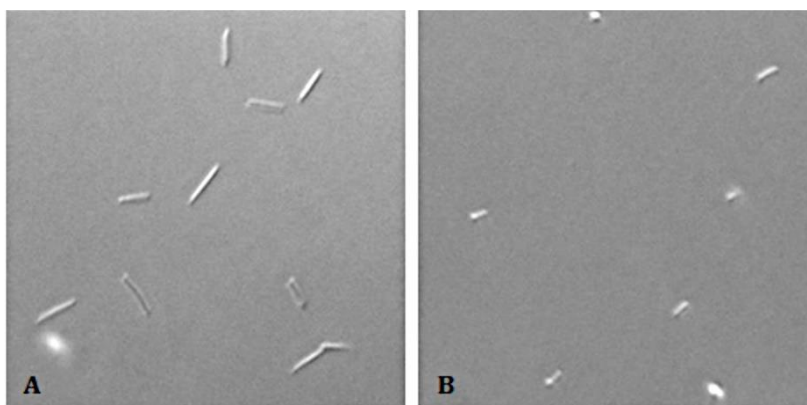


Figure 73 : Raccourcissement des bâtonnets de Rta due à l'effet de la pression osmotique, en présence de 0,3 % NaCl. Observation en microscopie en contraste de phase. A) Des bâtonnets longues sont présents dans la culture témoin, incubée dans TSB/10, sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 4 jours B) Une raccourcissement des bâtonnets avec deux à trois fois est observé dans TSB/10 0,3 % NaCl (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 4 jours).

Les images en présence de KCl sont identiques et les bâtonnets se raccourcissent à partir de 0,3 % KCl (Fig. 74B et C). Des gros kystes et des bâtonnets atypiques sont présents aux concentrations plus élevées de KCl comme 0,6 % (Fig. 74D et E), où la croissance de Rta est fortement diminuée (Fig. 27). Ces kystes sont issus de l'agrégation de plusieurs kystes dans une enveloppe commune, signe d'une résistance renforcée aux conditions défavorables.

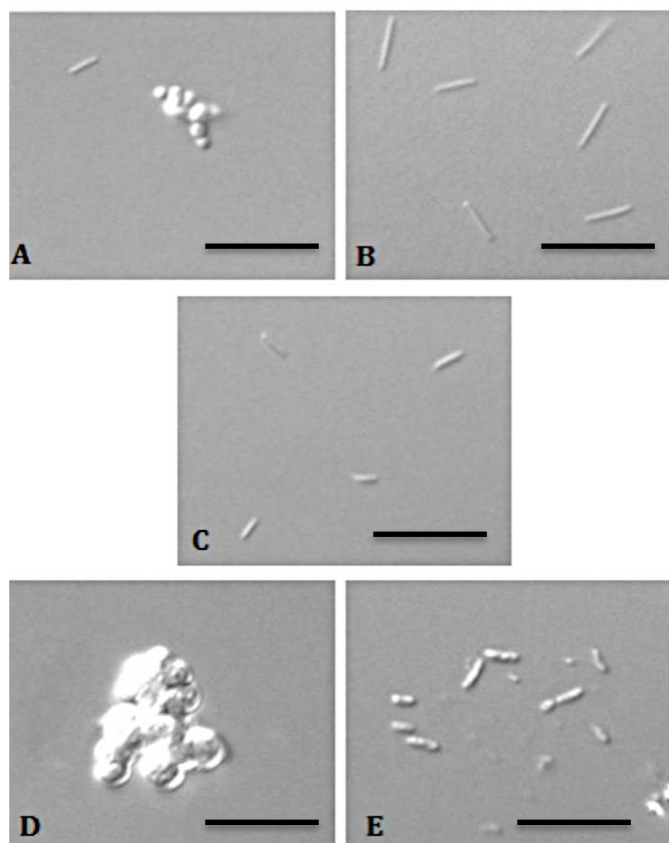


Figure 74 : Effet de la pression osmotique, causée par des concentrations variables en KCl, sur la forme de Rta. Observation en microscopie en contraste de phase : **A)** d'un agrégat de kystes et **B)** des bâtonnets dans la culture témoin, incubée dans TSB/10, sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 4 j. **C)** Une raccourcissement des bâtonnets avec deux à trois fois dans le milieu TSB/10, où le NaCl était éliminé de sa composition et remplacé par KCl 0,3 % (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 4 j). **D)** Agrégat avec des gros kystes, probablement due à l'enrobage commun de plusieurs kystes à la fois, et **E)** bâtonnets atypiquement épaisses qui semblent d'être en division dans le milieu TSB/10, où le NaCl était éliminé de sa composition et remplacé par KCl 0,6 % (incubation sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 4 j). Barre d'échelle : 20 µm.

L'effet de la pression osmotique est encore plus remarquable en observant des colonies sur un milieu gélosé supplémenté avec 0,4 % NaCl. Le profil du centre d'un dépôt de Rta peu importe le milieu gélosé, incubé en obscurité à 30 °C, habituellement représente un empilement de kystes (Fig. 75A). Seulement dans le cas où la culture de Rta est déposée sur un milieu TSA/10 0,4 % NaCl, des agrégats de gros kystes apparaissent au centre du dépôt (Fig. 75B).

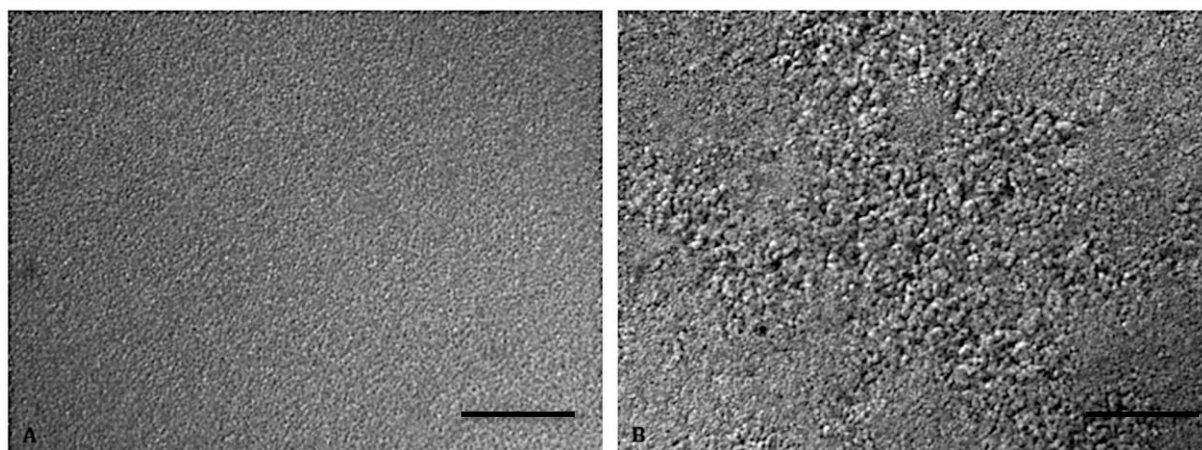


Figure 75 : Enkystement de Rta sur milieu gélosé en présence de NaCl. **A)** L'allure du centre de dépôt sur TSA/10 + β -hydroxybutyrate 10 mM d'une culture de Rta dans TSB/10 + β -hydroxybutyrate 10 mM représente un champ de kystes. **B)** Dans le centre de dépôt sur TSA/10 + 0,4 % de cultures de Rta dans TSB/10 NaCl 0,4 % sont présents également des gros kystes. A et B sont des dépôts de cultures incubées sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j. La croissance sur boîte est réalisée en obscurité à 30 °C pendant 5 jours. Barre d'échelle : 20 μ m.

Une coloration spécifique avec calcofluor et observation en microscopie à fluorescence révèle que les agrégats de gros kystes sont en effet créés par l'enrobage commun de plusieurs kystes (Fig. 76).

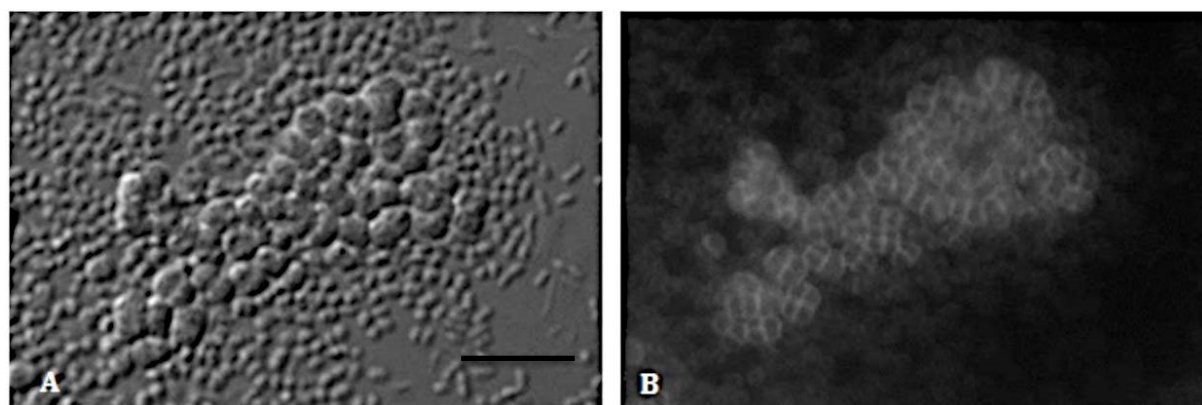


Figure 76 : Enrobage commun de plusieurs kystes dans des gros agrégats de kystes. **A)** Gros kystes observé en microscopie en contraste de phase. Le dépôt de culture de Rta est incubé dans TSB/10 β -hydroxybutyrate 20 mM sous agitation 150 rpm, à 30 °C pendant 3 j. **B)** La même photo en microscopie à fluorescence où le dépôt est marqué au Calcofluor white. Barre d'échelle : 20 μ m.

Malgré l'évidence de l'altération dans les dimensions et la forme de Rta, un grand nombre des bâtonnets même raccourcis sont présents dans les cultures supplémentées de NaCl. Nous pourrions estimer le pourcentage de kystes à partir des photos microscopiques prises sur plusieurs champs de vision et ainsi estimer l'enkystement de Rta dans les conditions différentes. De cette façon, nous avons mis en évidence qu'une culture témoin dans TSB/10 a une faible tendance de s'enkyster dans le temps (Fig. 77). Si dans une telle culture est rajouté du NaCl en phase exponentielle (au troisième jour de culture) jusqu'à une concentration finale de 0,4 %, le pourcentage de kystes augmente

significativement au quatrième jour et une augmentation encore plus forte, avec environ trois fois, est observée au cinquième jour de culture (Fig. 77).

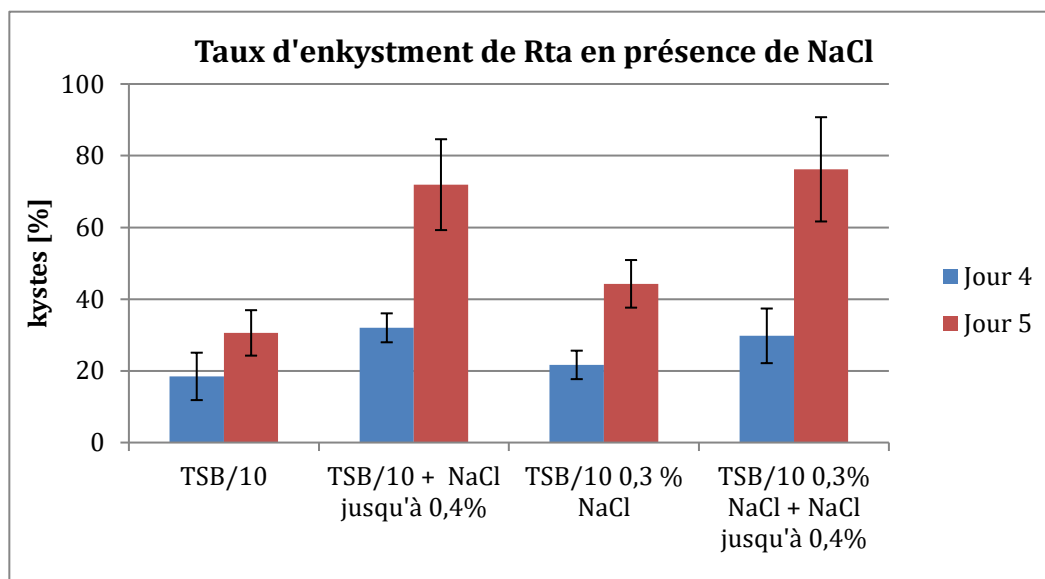


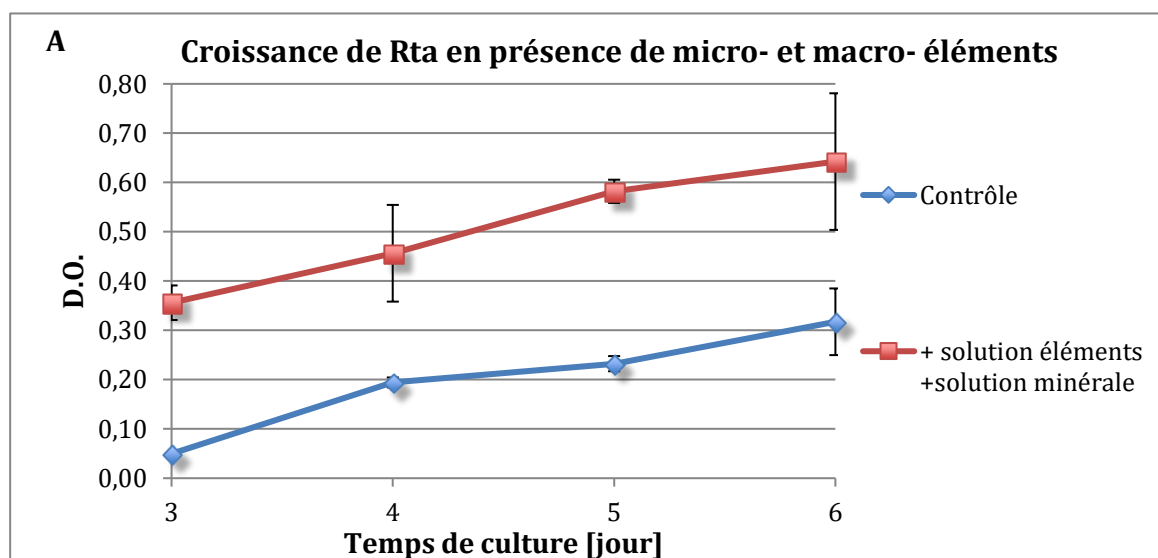
Figure 77 : Taux d'enkystement de Rta pendant le quatrième et le cinquième jour de culture, influencé par la présence de NaCl qui était soit ajouté dans la phase exponentielle au troisième jour de culture jusqu'à une concentration finale de 0,4 %, soit en début de la culture en concentration finale 0,3 %. L'incubation des cultures est faite sous agitation 150 rpm, à 30 °C. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

Nous n'observons pas la même tendance si le NaCl est rajouté au début de culture et une culture de Rta dans TSB/10 0,3 % NaCl a le même taux de kystes au quatrième jour que le contrôle TSB/10. Cependant au cinquième jour de culture le taux de kystes dans de TSB/10 0,3 % NaCl est significativement plus important que celui de témoin. Dans une telle culture nous remarquons encore une fois que l'enkystement est stimulé par le rajout de NaCl dans la phase exponentielle. Ainsi si la culture de Rta dans TSB/10 0,3 % NaCl est supplémentée avec NaCl jusqu'à 0,4 % au troisième jour, le pourcentage des kystes au cinquième jour augmente significativement avec environ trois fois et même ce pourcentage est comparable avec celui de cinquième jour de culture TSB/10 où la concentration de NaCl est augmenté jusqu'à 0,4 % (Fig. 77).

ANNEXE 2 : Besoin de micro- et de macro - éléments

Comme décrit dans la synthèse bibliographique (cf. paragraphes 5.1.2.3. et 5.1.2.4.) les bactéries ont besoin pas seulement d'une source de carbone et d'azote pour leur croissance mais également d'une vaste gamme d'autres éléments comme des métaux, des semi-métaux, de soufre, de phosphore, etc. Donc, il ne suffit pas d'augmenter juste les concentrations en tryptone et en extrait de levure pour obtenir des bons rendements en biomasse, il faudra également rajouter des solutions minérales et des solutions d'éléments traces. Ces sont des types de solutions souvent utilisées dans la composition de plusieurs milieux complexes. Un milieu complexe de ce genre est le milieu RCV (Weaver PK *et al.*, 1975). La composition de la solution minérale et de la solution d'éléments traces utilisées pour sa conception contiennent les éléments : Mg, Ca, Fe, Zn, Mn, Mo, B, Cu, S ; ainsi que le composé EDTA (Tritriplex II).

Les premiers essais de croissance de Rta en présence de la solution minérale et d'éléments traces ont été réalisés en batch. Le milieu de culture de base est composé de tryptone 4 g/L, extrait de levure 1,3 g/L et 10 mM lactate, le pH de départ est ajusté à 7. Une croissance significativement plus importante (x 2) est atteinte quand la solution minérale et d'élément traces sont rajoutés par rapport à la même culture sans ajout des solutions (Fig. 78A). De plus les cultures supplémentées des solutions sont riches en agrégats de kystes. Cette augmentation de la croissance de Rta est accompagnée d'une augmentation plus importante dans le pH et donc, un rajout plus important d'acide lactique (Fig. 78B).



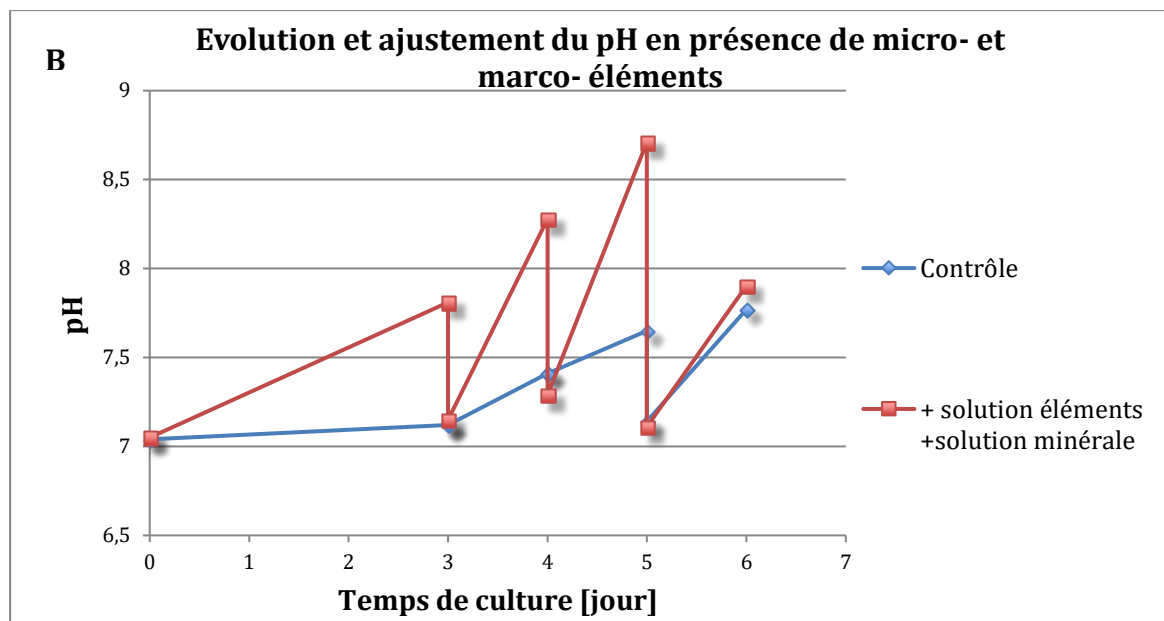


Figure 78 : Effet de l'ajout de solution minérale et d'éléments traces dans le milieu de culture, composé de tryptone 4 g/L, extrait de levure 1,3 g/L, lactate 10 mM, sur le développement de Rta (incubation dans des fioles erlenmeyer, sous agitation 150 rpm, à 30 °C). L'ajustement du pH est fait une fois chaque jour, à partir de la troisième journée, avec de l'acide lactique 10 %. **A)** Evolution de la D.O. dans le temps. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types à la moyenne.

B) Evolution du pH dans le temps.

Cette composition du milieu de culture donne le meilleur rendement en biomasse obtenu en batch et la tendance est maintenue en fed-batch avec un taux important d'agrégats de kystes (cf. paragraphe 3.2.3).

ANNEXE 3. Présence et nature des lipides (HPLC) dans l'EPS de Rta

L'insolubilité de l'EPS peut être interprétée comme étant due à la présence des liaisons hydrophobes au sein du polymère. Nous avons voulu évaluer le degré de contamination par des lipides. Nous pouvons considérer que l'analyse élémentaire, qui montre la présence essentiellement de monosaccharides, n'est pas assez spécifique pour conclure sur la présence de lipides. Pour vérifier la possibilité que les échantillons contiennent des acides gras, nous avons effectué une extraction, quantification et détermination du type de lipides par HPLC.

Dans cette expérience nous avons utilisé les échantillons d'EPS (Ferm 1, 2 et 3) issus de réplicats d'extraction, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir de trois cultures de Rta obtenues en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1). Les lipides de ces trois échantillons d'EPS ont été extraits selon la méthode de Folch (1957). Tout d'abord nous ne quantifions que 1,5 % en moyenne de lipides ce qui représente un taux de contamination assez faible. Concernant la nature de ces lipides, l'analyse HPLC permet de détecter la présence des lipides neutres, notamment des triglycérides, des monoglycérides et des acides gras libres (Fig. 79). La concentration cumulée de ces trois familles de molécules à partir de tous les lipides quantifiés est environ 27 % en moyenne. Le reste des lipides se trouve généralement dans un grand pic non identifié (Fig. 79).

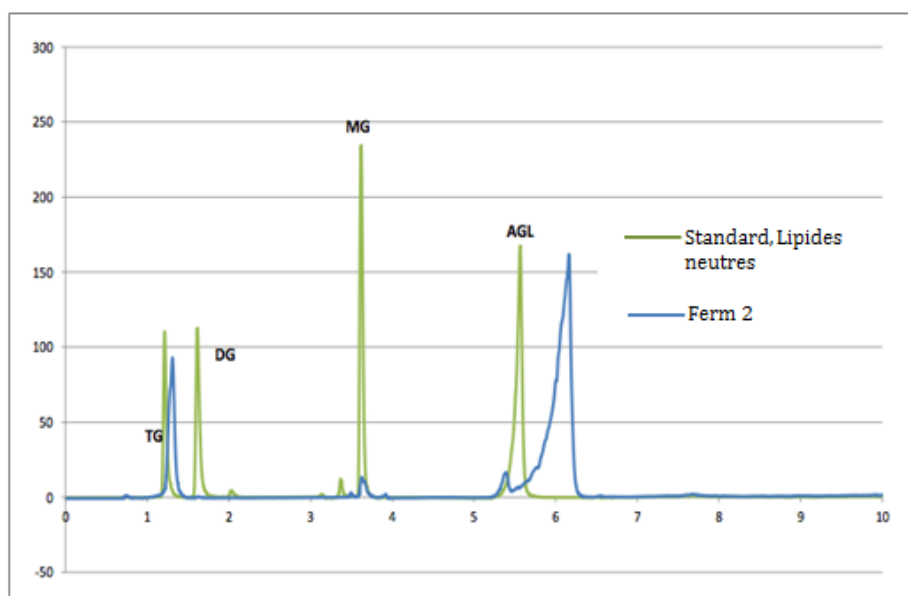


Figure 79 : Identification par HPLC de la présence des lipides neutres dans l'échantillon d'EPS de Rta issu d'extraction, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir d'une culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1), Les pics de rétentions sont comparés au standard composé des acides gras libres (AGL) et de mono- (MG), di- (DG) et triglycérides (TG).

Le profil observé pour l'échantillon Ferm 2 est identique à celui des autres deux échantillons, Ferm 1 et Ferm 3 (Fig. 80). La seule particularité observée est une quantité environ deux fois plus importante des triglycérides dans l'échantillon Ferm 3.

Cependant cette augmentation n'est pas en accord avec la quantité de lipides totaux qui est la plus faible parmi les trois échantillons.

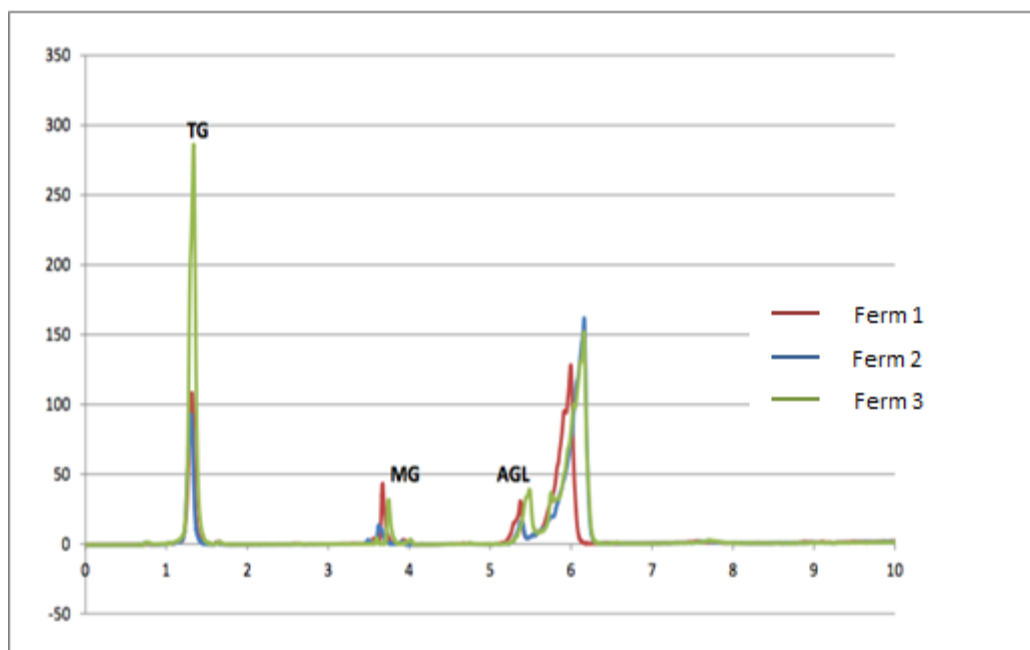


Figure 80 : Profils HPLC des extraits lipidiques totaux des échantillons d'EPS de Rta issu d'extraction, selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir de trois répliquats de culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., chapitre 1).

Le gros pic inconnu peut être formé par des glycolipides et/ou des lipides polaires. Pour identifier la nature de ces 73 % en moyenne de lipides inconnus, un fractionnement d'extraction sur phase solide est fait pour un quatrième échantillon issu d'un répliquat. Ce fractionnement montre que les triglycérides, les monoglycérides et les acides gras libres sont majoritaires parmi les lipides neutres et ils représentent 99,9% (Fig. 81). Ce pourcentage se répartit en 58,2 % de triglycérides, 5,2 % de monoglycérides et 36,5 % d'acide gras libres. Ainsi les fractions de glycolipides sont très faibles. Le grand pic non identifié selon ces résultats pourrait être un lipide polaire. Il est le dernier à être élué parce qu'il a plus d'affinité pour la colonne que pour le solvant et donc, pour l'éluer il faut augmenter la polarité du solvant. Ainsi seulement la phase polaire contient le pic majoritaire de l'extrait total même si la quantité est moins que celle attendue. Donc, il semble que ce lipide reste en partie adsorbé sur la cartouche de silice (Fig. 81). La nature de ce lipide reste indéterminée après cette analyse. En tout cas il n'est pas très polaire, moins que la phosphatidyléthanolamine et son temps de rétention est plus proche par exemple de phosphatidylglycérol ou de cardiolipine qui sont des lipides essentiellement membranaires chez les bactéries.

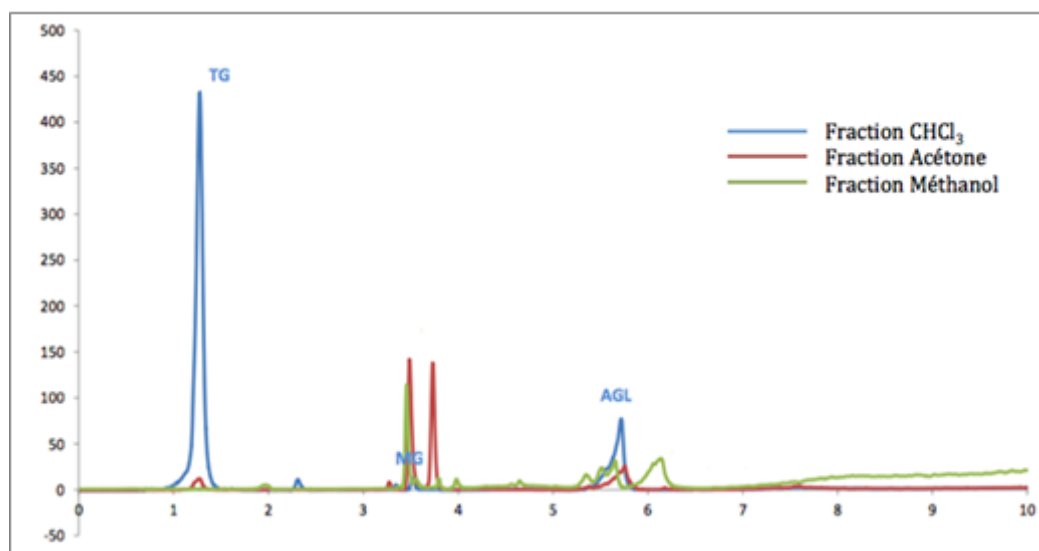


Figure 81 : Profil HPLC de fraction CHCl_3 éluant les lipides neutres, acétone éluant les glycolipides et méthanol éluant les phospholipides sur une extraction sur phase solide. L'échantillon utilisé est extrait selon le protocole décrit dans paragraphe 3.1. (Chapitre 2, Fig. 42), à partir d'un réplikat de culture de Rta obtenue en fed-batch dans le milieu optimisé (cf. paragraphe 3.2.3., Chapitre 1).

En conclusion environ 1,5 % de lipides en moyenne sont présents dans les échantillons. Cela indique une quantité peu importante en acides gras. Le profil HPLC montre la présence majoritaire des lipides polaires compatible avec une extraction partielle de la membrane externe des cellules bactériennes lors de l'extraction de l'EPS. Selon cette quantification des lipides, l'insolubilité de l'EPS est plutôt due à sa structure comme par exemple la présence des liaisons de type β .

ANNEXE 4 :

Les amorces utilisées dans cette étude :

Amorces	Séquence	Références
Rta_08680_Fw	CATCGGCTCCAAC TTCGTTCTG	Cette étude
Rta_08680_Rev	CACGTGGGATTTCGGCTGC	Cette étude
Rta_08810_Fw	ATACTTGCGCAGACACGTCCG	Cette étude
Rta_08810_Rev	GTGCTGCCTAAATCCTGCCC	Cette étude
Rta_08780_Fw	TGCGGGACCTGAATATTGCCG	Cette étude
Rta_08780_Rev	GTAGGAAAGGAAGGCGAGCAATAG	Cette étude
Rta_08740_Fw	CCCCGAGAAACAGGACATGC	Cette étude
Rta_08740_Rev	CAAGCTCGGTCAAACGTTCC	Cette étude
Rta_10900_Fw	GCAACTCCACTCTCCAACC	Cette étude
Rta_10900_Rev	CGAAGCGGATGTCATTGTC	Cette étude
Rta_10880_Fw	ATCGTCATCCCTCTGTACAAC	Cette étude
Rta_10880_Rev	CAGCTCGACCTTGCAAAAC	Cette étude
Rta_10870_Fw	AGCTCCTGTCTTGTTCGGT	Cette étude
Rta_10870_Rev	CCAGGATGTAGACGTACTCCC	Cette étude
Rta_10830_Fw	GCCAAGTGC GATTCCGGAAC	Cette étude
Rta_10830_Rev	CAGCAGTCCCGGTGTCAG	Cette étude
Rta_prom_10950_Fw	CATAATGCATCACCAGGGCCGCGAC	Cette étude
Rta_prom_10950_Rev	CATATCTAGATCCTCCGCGACTGGCCGTTTCCG	Cette étude
Rta_prom_10910_Fw	CATAATGCATCACAGCCCGGCGAACAG	Cette étude
Rta_prom_10910_Rev	CATATCTAGATCCTCCGGTCTGGCAGTGAGTCC	Cette étude
Rta_prom_10900_Fw	CATAATGCATGGACTCACTGCCAGGACC	Cette étude
Rta_prom_10900_Rev	CATATCTAGATCCTCCGTTCCCTGCGCCGTGG	Cette étude
Egfp_Fw	AAAATTCTAGAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Cette étude
Egfp_Rev	AAAATCCGCGGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	Cette étude

ANNEXE 5 :

Les numéros d'ont référence aux structures du Tableau Structures			Les numéros d'ont référence aux structures du Tableau Structures		
Masse monoisotopique [M-H2O]			Masse monoisotopique [M-H2O]		
struturcures du Tableau Structures			struturcures du Tableau Structures		
potentielles"			potentielles"		
CH3(-H)		14,01565	Tri-pentose		396,12684
H2O		18,01057		53	400,1580763
C1H2O		30,01057		58	402,1162115
C(O)CH3(-H)Acetate		42,01057		68	406,11111261
C2H2O2		58,00549		78	406,11111261
C2H4O2O,2A		60,02114		72	408,1267762
C2H6O3	93	78,03171		82	408,1267762
		82,12717013		86	410,1576824
C3H6O3		90,03169405		75	414,1373409
C4H6O3(60+42)O,2AvecAcetate		102,03171		57	420,1267762
1,2linkedDihamnoseC4H8O3O,2X		104,0473441		62	420,1267762
Deoxypentose*(-)(deoxyribose)		116,04736		90	422,1060408
C5H12O3		120,0786442		79	424,1216908
Pentose		132,04228		83	426,1373409
ketodeoxyhexoseO		144,04228	Pentose-pentose-hexose		426,13741
Deoxyhexose(Rhamnose)		146,05793	Hexose-pentose-pentose		426,13741
	3	158,02155		61	438,1373409
O-MethylRhamnose		160,07358		66	438,1373409
GlucosamineNH2		161,14551		91	440,1166054
Hexose		162,05285	hexose-PentoseDeoxyhexose		440,15306
	2	162,05285		95	444,1479056
Di-OMethylRhamnose		174,08923		70	448,1216908
GlucuronicAcid		176,03212		74	450,1373409
	4	176,03212		65	456,1479056
O-Methylhexose		176,0685		77	456,1479056
DeoxyhexoseAcetate		188,09461	GlucuronicPentosePentose		457,119974
N-Acetylhexosamine		203,19723		69	466,1322555
HexoseAcetate		204,06342		81	466,1322555
Di-OAc-Rhamnose		230,07907		73	468,1479056
GlucoseoxofuranoseO		246,07399		85	468,1479056
Pentose-Deoxypentose		248,08964	GlucuronicHexosePentose		470,12725
	8	258,07399		89	470,1788118
Di-pentose		264,08456		76	474,1584703
	6	264,08456		94	482,1271701
	11	264,08456		80	484,1428202
	15	274,06891	GlucuronicHexoseDeoxyhexose		484,1429
	19	274,10529		84	486,1584703
	9	276,08456		96	486,1584703
HexoseDeoxypentose		278,10021	Hexose-hexose-hexose		486,15855
Pentose-Deoxyhexose		278,10021		88	488,1893765
	12	282,09513		92	500,1377348
	27	290,063782	GlucuronicHexoseHexose		500,13782
	16	292,07948		95	504,1690349
	31	292,115818	4pentoses		528,15499
	20	292,11586		87	536,1682471
Hexose-Pentose		294,09513		97	554,1271701
	24	294,09513		49	558,055187
	23	276,0845175	3pentoses1hexose		558,17498
	39	304,1158176		98	572,1377348
	35	304,1733325	2pentoses2hexoses		588,19025
	43	306,0950822	2hexoses1pentose1deoxyhexose		602,19178
	28	308,0743467	GlucuronicPentosePentoseRhamnose		603,177894
HexoseDeoxyhexose		308,11078		100	614,1482995
	32	310,1263823	GlucuronicHexosePentoseDeoxyhexose		616,18518
	36	312,1056468		99	632,1588642
	47	320,0743467	4hexoses		648,19727
	40	322,1263823		101	702,1643435
	51	322,1263823		102	720,1749082
	44	324,1056468	3pentoses2hexoses		720,23254
Hexose-hexose		324,1057	2pentoses2hexoses1deoxyhexose		734,24819
	7	324,1057		104	762,1854728
	14	324,1057	Glucuronic2pentoses2hexoses		764,22238
Glucuronicpentose		325,077694		105	766,0653577
Glucuronicpentose		325,077694		109	766,134619
	18	334,09005		113	768,1232665
	22	334,12643		103	

ANNEXE 6 :
Les spectres RMN :

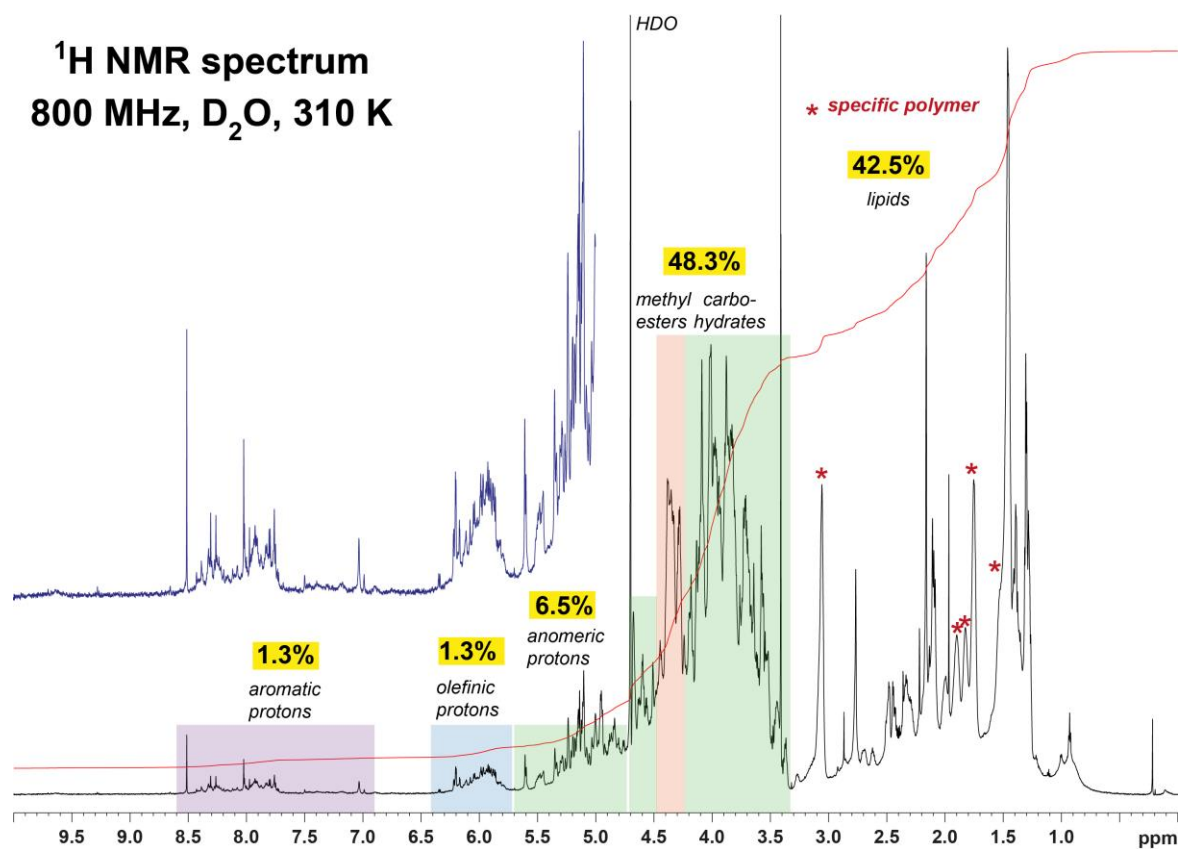


Figure 82 : Spectre ^1H RMN de l'EPS de Rta dans D_2O (800 MHz, 310 K) et taux des sous-structures principales.

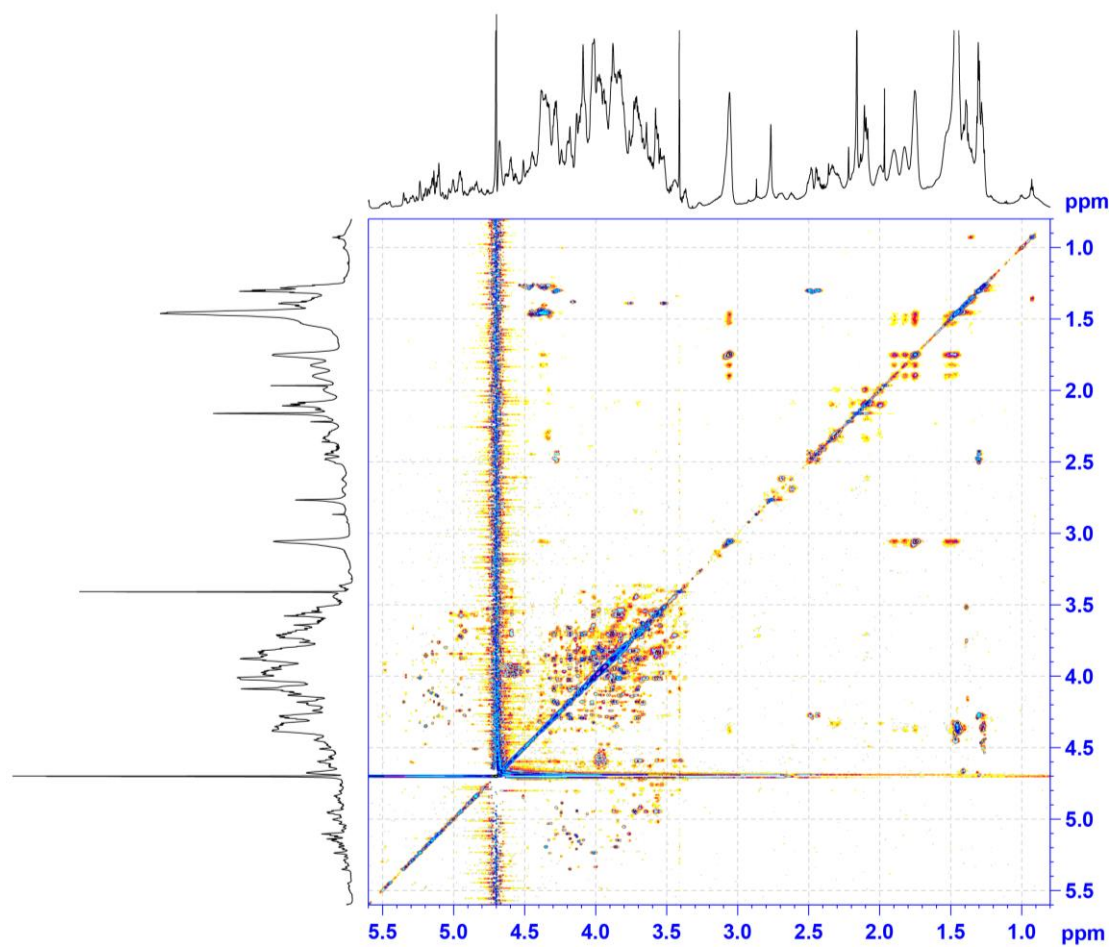


Figure 83 : Spectre RMN ^1H , ^1H TOCSY (temps de mélange = 70 msec) représentant la section aliphatique de l'EPS de Rta dans D_2O (800 MHz, 310 K).

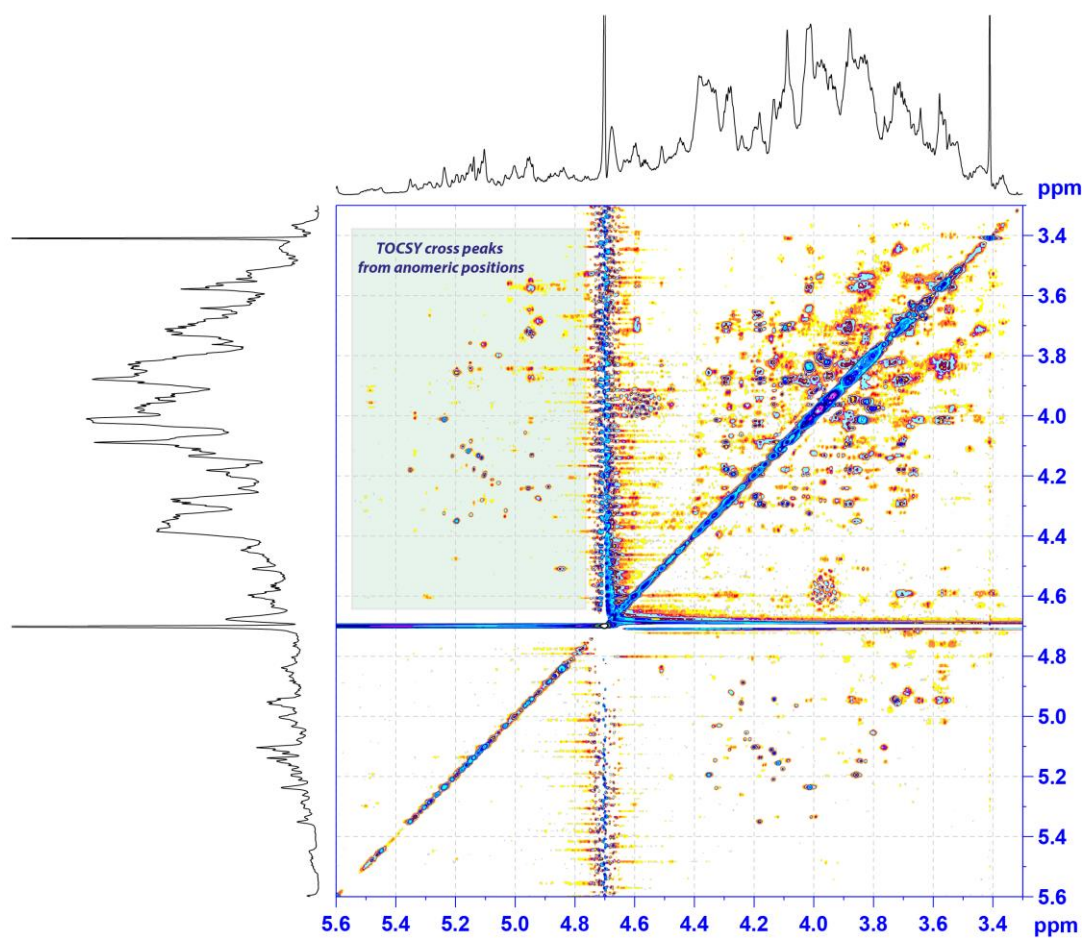


Figure 84 : Spectre RMN ^1H , ^1H TOCSY (temps de mélange = 70 msec) représentant la section saccharide de l'EPS de Rta dans (800 MHz, 310 K). Plus de 35 pics de corrélation provenant de protons anomériques confirment la présence d'un matériel complexe.

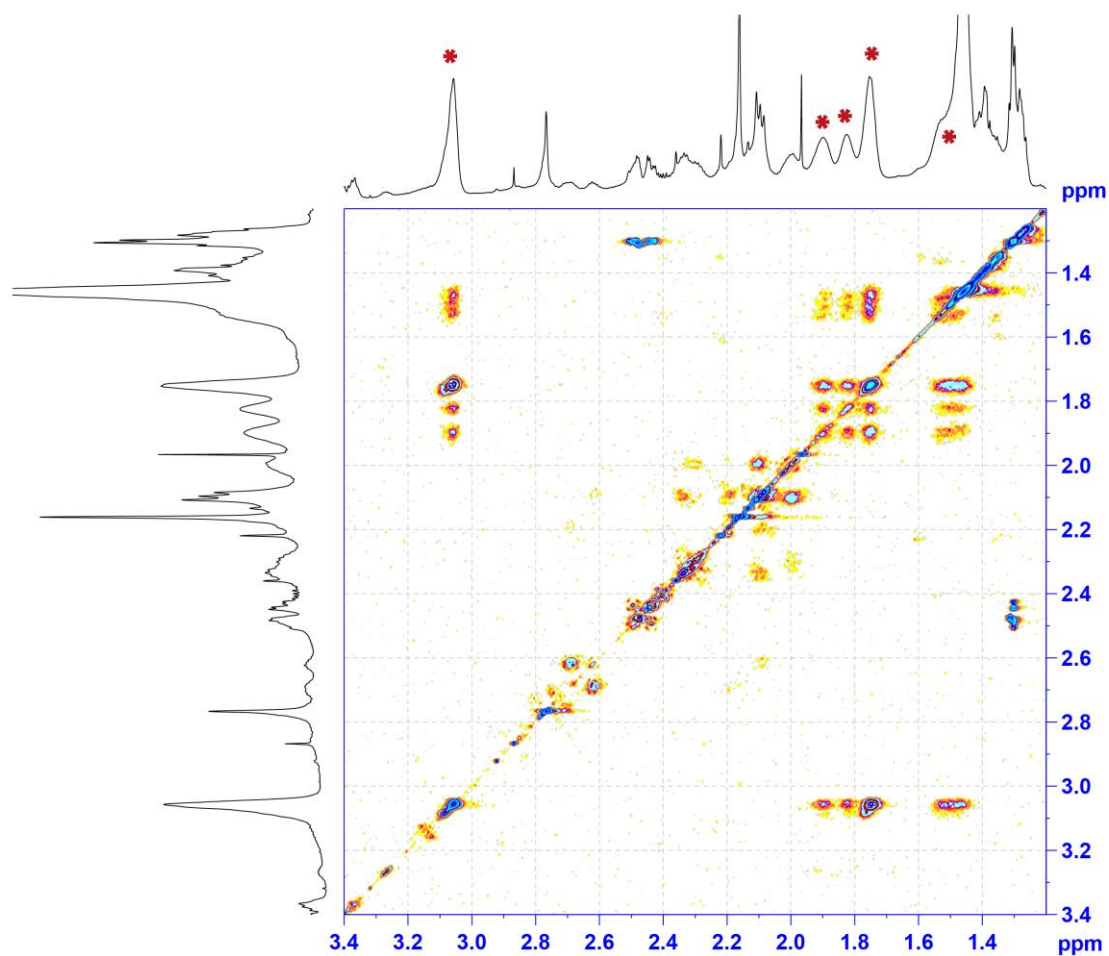


Figure 85 : Spectre RMN ^1H , ^1H TOCSY (temps de mélange = 70 msec ; 800 MHz, 310 K) représentant une molécule aliphatique spécifique, possiblement un polymère contenant de l'azote (à voir également le spectre RMN ^1H , ^{13}C DEPT-HSQC).

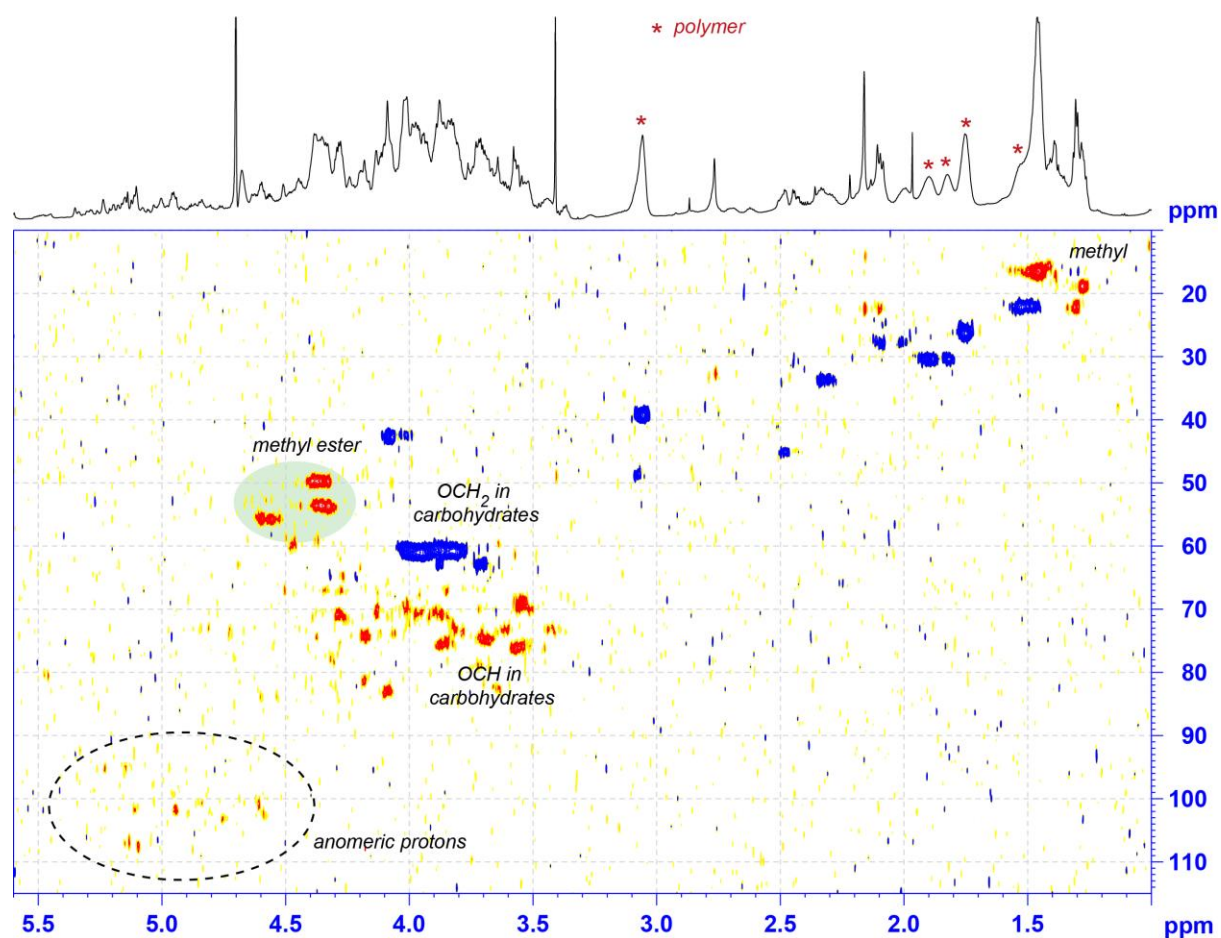


Figure 86 : Spectre RMN ^1H , ^{13}C DEPT-HSQC (sélectif pour CH_2 : les carbones de méthylène présentent des pics de corrélation bleus, et ceux de méthyle et méthine et des pics de corrélation rouges; 800 MHz, 310 K). Le polymère (*) contient très probablement un arrangement cyclique d'atomes de carbone de méthylène, sans contact direct avec l'OCH.

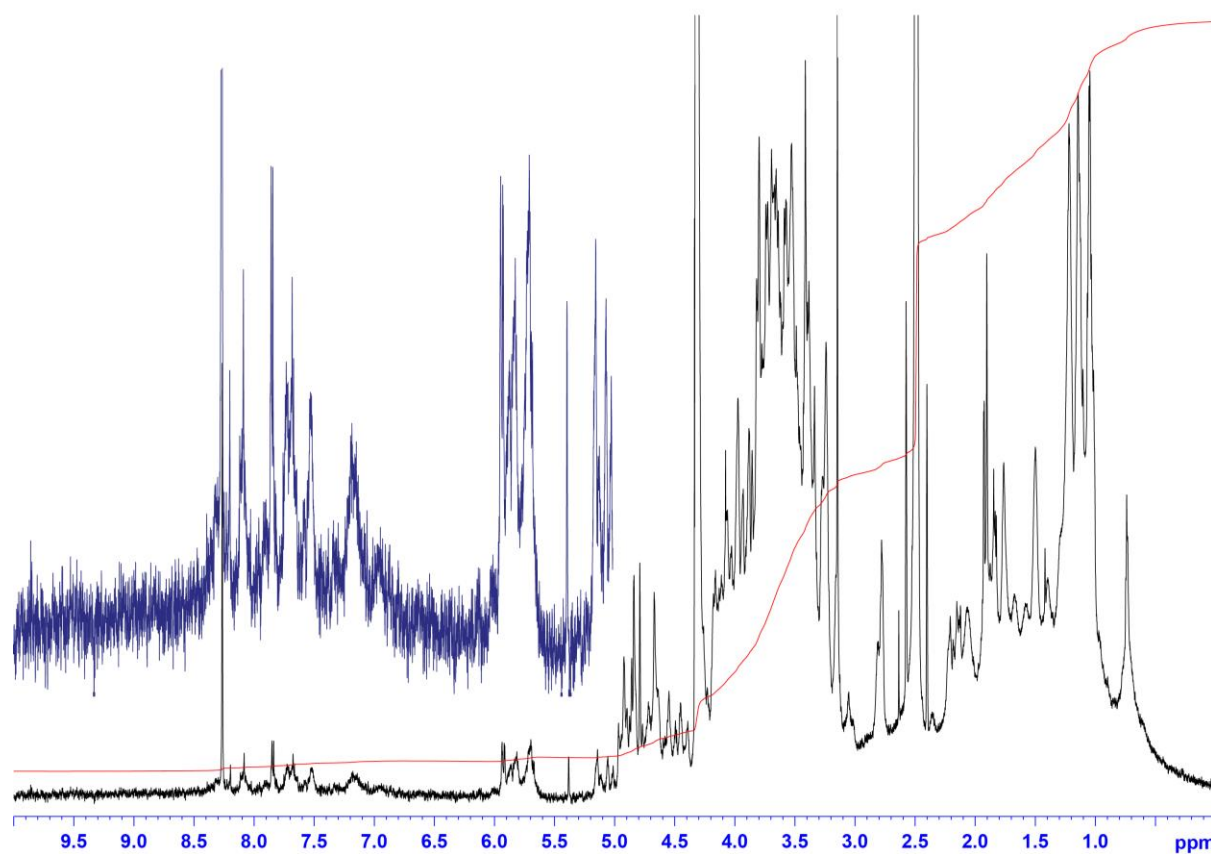


Figure 87 : Spectre ^1H RMN de l'EPS de Rta dans un mélange D_2O / DMSO-d_6 (environ 50/50 v/v; 800 MHz, 310 K), montrant un comportement de solubilité légèrement différent

Résumé

Les exopolysaccharides (EPS) bactériens peuvent avoir une haute valeur ajoutée quand ils sont utilisés comme agents de rétention d'eau par exemple en cosmétologie. Les objectifs de ce travail de thèse, en accord avec la société ARD (financement de la convention CIFRE-ANRT), étaient d'optimiser la production d'EPS par la bactérie *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (Rta), de caractériser biochimiquement sa structure et d'identifier les gènes impliqués dans sa production. *R. tataouinensis* TTB310 (Rta) a été isolée d'un sol semi-aride dans le sud-tunisien et possède quelques propriétés particulières : elle possède un cycle cellulaire original avec la production i/ de bâtonnets mobiles sensibles à la dessiccation et ii/ de kystes non-mobiles produisant un EPS lui permettant de tolérer la dessiccation. La principale originalité est que les kystes sont capables de se diviser et donc de synthétiser l'EPS au cours de la division cellulaire. L'optimisation de la production d'EPS de Rta s'est faite en conditions de fed-batch après des expériences préliminaires réalisées en batch ayant conduit au choix du lactate comme la source de C et d'énergie. Le résultat original de cette partie du travail a été de réussir à maintenir un pH neutre sur plusieurs jours de croissance avec de l'acide lactique utilisable par ailleurs comme source de C et d'énergie. Nous avons ainsi réussi à produire des quantités d'EPS en une seule phase de croissance puisque la production d'EPS a lieu au cours des divisions cellulaires des kystes. Nous avons également optimisé l'extraction de l'EPS fermement attaché à la surface des bactéries en utilisant de l'acide trichloroacétique. La caractérisation biochimique de l'EPS a été réalisée en combinant différentes techniques et approches : CPG, FTICR-MS, RMN et FTIR. L'unité répétée de l'EPS de Rta est un décasaccharide constitué de ribose, glucose, rhamnose, galactose, mannose, acide glucuronique (ratio 3/2/2/1/1/1), et avec des substituants tels que acétyl, succinyle et méthyle. Enfin, grâce au génome entièrement séquencé de Rta dont nous disposons, nous avons identifié, par des approches de biologie moléculaire et d'imagerie, le cluster de gènes (dont quatre glycosyltransférases), impliqués dans la production d'EPS par les kystes de Rta. La connaissance de la structure de l'EPS de Rta permettra de mettre au point les modifications physico-chimiques nécessaires à sa solubilisation pour en étudier les propriétés rhéologiques.

Abstract

Bacterial exopolysaccharides (EPS) can have a high added value when used as water retention agents for example in cosmetology. The objectives of this thesis work, in agreement with ARD company (financing of the CIFRE-ANRT agreement), were to optimize the production of EPS by the bacterium *Ramlibacter tataouinensis* TTB310 (Rta), to biochemically characterize its structure and to identify the genes involved in its production. *R. tataouinensis* TTB310 (Rta) has been isolated from a semi-arid soil in southern Tunisia and has some special properties: it has an original cell cycle with the production of i/mobile rods sensitive to desiccation and ii/ non-mobile cysts producing an EPS allowing it to tolerate desiccation. The main originality is that cysts are able to divide and thus synthesize EPS during cell division. Rta's EPS production was optimized under fed-batch conditions after preliminary batch experiments that led to the choice of lactate as the source of C and energy. The original result of this part of the work was to maintain a neutral pH over several days of growth with lactic acid that could also be used as a source of C and energy. We have thus succeeded in producing quantities of EPS in a single growth phase since the production of EPS takes place during the cellular divisions of the cysts. We also optimized the extraction of EPS firmly attached to the bacteria surface using trichloroacetic acid. The biochemical characterization of Rta EPS was performed by combining different techniques and approaches: CPG, FTICR-MS, RMN and FTIR. The repeated unit of Rta EPS is a decasaccharide consisting of ribose, glucose, rhamnose, galactose, mannose, glucuronic acid, with the following ratio 3/2/2/1/1/1, and with substituents such as acetyl, succinyl and methyl. Finally, thanks to the availability of the fully sequenced Rta genome, we have identified, through molecular biology and imaging approaches, the gene cluster (including four glycosyltransferases) involved in the production of EPS by Rta cysts. Knowledge of the structure of Rta's EPS will make it possible to develop the physico-chemical modifications necessary for its solubilization in order to study its rheological properties.