



HAL
open science

Bio-prospection et biodiversité des micro-organismes des milieux atypiques des lagons de la Nouvelle-Calédonie : Premières évaluations du potentiel de production de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique

Elefthérios Chalkiadakis

► To cite this version:

Elefthérios Chalkiadakis. Bio-prospection et biodiversité des micro-organismes des milieux atypiques des lagons de la Nouvelle-Calédonie : Premières évaluations du potentiel de production de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique. Bactériologie. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2013. Français. NNT : 2013NCAL0054 . tel-02967467

HAL Id: tel-02967467

<https://unc.hal.science/tel-02967467>

Submitted on 15 Oct 2020

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

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

UNIVERSITÉ DE LA NOUVELLE-CALÉDONIE

Ecole Doctorale du Pacifique (ED 469)

**Bio-prospection et biodiversité des micro-organismes des milieux atypiques
des lagons de la Nouvelle-Calédonie.**

**Premières évaluations du potentiel de production de nouvelles molécules
d'intérêt biotechnologique**

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biotechnologie marine

Pour l'obtention du grade de docteur

Présentée par :

Elefthérios CHALKIADAKIS

Le 16 décembre 2013

Devant le jury composé de :

Valérie Langlois	Professeur, Institut de Chimie des Matériaux de Paris Est	Rapporteur
Bernard Ollivier	Docteur (DR), Institut Méditerranéen d'Océanographie	Rapporteur
Claude Payri	Professeur, Institut de Recherche pour le Développement	Examineur
Hamid Amir	Professeur, Université de la Nouvelle Calédonie	Examineur
Christelle Simon-Colin	Docteur, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer	Directeur
Myrielle Dupont-Rouzeyrol	Docteur, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie	Co-encadrant

A ma Femme,

A ma Famille et mes Amis,

A Celles et Ceux qui ont cru en moi et m'ont soutenu.

« Savoir s'étonner à propos est le premier pas
fait sur la route de la découverte. » Louis Pasteur

« L'innovation, c'est une situation qu'on choisit parce qu'on
a une passion brûlante pour quelque chose. » Steve Jobs

Pour ma directrice et mon encadrante :

« Il n'y a pas d'innovation sans désobéissance. » Michel Millot

Remerciements

Je souhaite adresser mes remerciements au Professeur Valérie Langlois et au Docteur Bernard Ollivier pour avoir accepté de participer à mon jury et juger ce travail.

Je tiens à remercier le Professeur Claude Payri qui a accepté d'examiner ce travail de thèse.

Mes remerciements vont aussi vers le Professeur Hamid Amir pour son encadrement, son accueil et son soutien. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Mes remerciements vont également à ma directrice de thèse, Christelle SIMON-COLIN et mon encadrante Myrielle DUPONT-ROUZEYROL, pour m'avoir accordé leur confiance et proposé un sujet aussi novateur qu'intéressant. Merci pour nos échanges scientifiques intéressants, cet encadrement exemplaire que j'ai reçu et que tout doctorant envierait ainsi que pour votre patience avec moi (et je sais qu'il en faut). Christelle merci d'avoir su me guider malgré l'éloignement géographique et d'avoir conservé cet aspect humain qui m'est cher lors de nos échanges. Myrielle merci pour ton encadrement et tes conseils, merci aussi d'avoir su trouver les mots pour m'orienter dans les moments de doutes et de m'avoir encouragé dans mes démarches de valorisation. Je pense qu'un paragraphe ne serait pas suffisant pour vous remercier toutes les deux comme il se doit, mais je dois m'arrêter là, il y a du monde ensuite ☺.

Cette thèse est le fruit d'un co-encadrement entre l'Institut Français de la Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) avec la participation de l'Université de la Nouvelle-Calédonie (UNC). L'IFREMER de Brest a rendu possible la transmission d'un savoir-faire dans la production, la purification et la caractérisation physico-chimique des polymères bactériens. Pour ce faire trois déplacements ont pu être organisés au Laboratoire de Biotechnologies et Molécules Marines de l'IFREMER à Brest. L'IPNC a offert son soutien logistique, son expérience et les outils nécessaires à la mise en place, l'hébergement et l'étude la collection de bactéries. L'UNC a mis à disposition des locaux et du matériel pour la production des polymères bactérien et son soutien dans la mise en place de la seconde bio-prospection. L'IFREMER de Nouvelle-Calédonie a, pour sa part, participé à la mise en place de la collection (prospection, locaux, choix des sites). Je

remercie donc l'ensemble de ces organismes qui m'ont accordé leur confiance et la chance de rendre possible le travail qui va vous être présenté.

Je remercie ceux avec qui j'ai commencé cette étude avant leurs départs en retraite et qui m'ont permis d'être accueilli à l'IFREMER et à l'IPNC, Mme Suzanne Chanteau et Mr Jean Guezennec. Mme Chanteau, je vous remercie pour votre engagement et votre motivation communicative à toute épreuve, vous avez incarné cet esprit scientifique cher à cet Institut que vous avez dirigé en Nouvelle-Calédonie. Jean merci de m'avoir transmis la passion pour les biotechnologies, pour tes conseils avisés et tes encouragements quant à la valorisation du savoir scientifique.

Je remercie également Lionel Loubersac pour son implication dans ce projet et son aide dans ma démarche de valorisation.

Merci à Cyrille Goarant, pour les nombreux conseils prodigués en phylogénie, pour toute l'aide apportée lors de la mise au point de protocoles, dans la relecture des articles et d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Merci à Thierry Laugier pour ta disponibilité ainsi que pour tes conseils et d'avoir fait partie de mon comité de thèse.

Merci à l'actuel directeur de l'IPNC, le Professeur Dominique Baudon pour m'avoir permis de continuer mon travail de thèse dans les meilleures conditions et pour m'avoir encouragé à valoriser mon travail.

Je remercie AST Intermedical pour m'avoir accordé son soutien financier durant les trois années de ma thèse.

Mes remerciements vont aussi au Ministère de l'Outre-Mer pour avoir cru en ce projet et octroyé à deux reprises son soutien financier afin de mener à bien cette étude.

À mes collègues et amis brestois Sophie Schmitt et Christophe Brandily, merci de m'avoir transmis et fait découvrir avec patience votre savoir-faire en microbiologie marine et en chimie analytique, votre disponibilité, votre bonne humeur et votre sympathie resteront gravées dans ma mémoire. À mes copains thésards du labo de Brest, à Marine Deschatre, organisatrice de Glucidoc et chélatrice de métaux un grand merci pour nos discussions, scientifiques et moins scientifiques, les moments de fous rires, ta bonne humeur et ta répartie.

Surtout ne change rien. Florian Lelchat pour les cours de sarcasmes, les discussions intéressantes et les sorties arrosées.

J'espère sincèrement que nous serons amenés à nous revoir et à retravailler ensemble.

À mes amis thésards de Nouvelle-Calédonie, Simon merci d'avoir partagé du temps avec moi à lever quelques verres en fin de semaine, à discuter de tout. Dans le même registre, merci à Marine, Polo, Nico et « toute la bande », avec qui on se retrouve pour partager les bons et les moins bons moments. Heureusement que vous tous étiez là, sans vous la thèse aurait été bien triste.

Un grand merci aux personnels et amis de l'IPNC : Mika, Rémi, Élodie, Fredo, Quentin, Noellie, Sylvestre, Laurent, Sylvain, Olivia, Carmen, Cécilou, Victoria, le groupe de l'open space et tous les autres membres du personnel qui par leur joie de vivre et leur bonne humeur ont contribué à une bonne ambiance de travail.

Un grand merci au personnel de l'UNC, de l'IFREMER de Nouvelle-Calédonie et de Brest que j'ai pu rencontrer pour leur accueil et leur sympathie.

Merci aussi aux stagiaires qui ont participé à ce travail de recherche Laurianne Lawak, Aurélie Lafon et Malorie Greene.

À ma team de JJB la TPS/GFT, mestre F. Girot et tous les copains, les sparings de fin de journées m'ont permis de bien décrocher.

Mes dernières pensées, et non des moindres, sont pour ma famille et mes proches de France et de Grèce qui malgré la distance m'ont toujours encouragé dans mes choix : mon père, ma mère, ma grand-mère, ma sœur et mes frères pour leurs encouragements et leurs soutiens sans faille : merci, ευχαριστώ.

À ma famille de Nouvelle-Calédonie : Pépé, Yannick et Kenzo qui m'ont permis de recréer un cocon familial si loin de chez moi.

Surtout à ma femme Mariko à qui je dois tout. Merci pour ton soutien, ta compréhension, tes encouragements et tes conseils. Toi qui es déjà passé par là tu étais plus que quiconque capable de comprendre et de supporter les contraintes d'une vie de thésard. Merci pour tous les efforts que tu as fait et pour toutes les bonnes choses à venir, sans toi je n'y serais pas arrivé.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
CONTEXTE DE L'ÉTUDE	18
I. PRESENTATION DU SUJET :	19
II. LES OBJECTIFS DE L'ETUDE	20
III. PRESENTATION DES DIFFERENTES PARTIES ABORDEES	21
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	23
I. ASPECTS DE LA BIOTECHNOLOGIE MARINE	24
A. Les différentes couleurs des biotechnologies	24
B. Valorisation de la ressource marine : le passé et l'avenir de notre société.....	26
1) La valorisation des organismes marins	26
2) Le cas des bactéries marines	27
C. Intérêts biotechnologiques des polymères bactériens	30
II. LES EXOPOLYSACCHARIDES (EPS).....	34
A. Description générale des EPS	34
B. Composition chimique.....	35
C. Rôle physiologique.....	38
D. Voies de biosynthèse	40
E. Les applications biotechnologiques des EPS bactériens	42
1) Exemples d'applications	43
2) Les milieux atypiques comme sources de nouveaux types d'EPS	47
III. LES POLYHYDROXYALCANOATES (PHA)	51
A. Le plastique dans notre société	51
B. Description générale des PHA	53
1) Structure chimique.....	53
2) Architecture macromoléculaire	57
3) Récupération des PHA	58
C. Voies de biosynthèse chez les bactéries.	60
D. Propriétés et applications des PHA	67
1) Propriétés chimiques.....	67
2) Propriétés physiques	67
3) Biodégradabilité.....	69

a. En milieu extérieur	70
b. La biodégradation in vivo	70
4) Biocompatibilité	71
E. Les applications biotechnologiques des PHA bactériens	71
1) Exemples d'applications	71
2) La valeur marchande	73

PARTIE II : LES BACTÉRIES DE NOUVELLE-CALÉDONIE : PROSPECTION, MISE EN COLLECTION ET PHYLOGÉNIE

I. PRESENTATION DE LA NOUVELLE-CALEDONIE.....	75
II. LE MATERIEL BIOLOGIQUE	76
A. Prospection, échantillonnage, et mise en collection.....	76
1) Les campagnes des prospections	76
2) Isolement et stockage des souches.....	78
a. Préparation des milieux de culture	78
b. Culture et isolement des souches	78
c. Conditionnement et stockage des isolats bactériens	79
d. Détermination des optimums de croissance	79
B. Identification et caractérisation des souches.....	82
1) Présentation générale des recommandations	82
2) Le mode opératoire	84
III. MATERIEL ET METHODES	85
A. Les premiers éléments de description.....	85
1) Les descriptions phénotypiques.....	85
2) Les caractérisations biochimiques	85
a. La coloration de Gram.....	86
b. Les tests catalase/oxydase.....	87
c. Les galeries API	87
B. Les outils en biologie moléculaire	89
1) Le séquençage génétique.....	89
a. Extraction de l'ADN	89
b. La préparation du séquençage.....	89
<input type="checkbox"/> L'amplification génétique	90
<input type="checkbox"/> La réaction de séquence	92
<input type="checkbox"/> La purification des produits de séquences	93
<input type="checkbox"/> Principe du séquenceur	93
2) Les analyses phylogénétiques.....	94
3) Les techniques moléculaires alternatives dans l'étude et l'identification des espèces bactériennes	95
a. Détermination du % G+C	96
b. La détermination du ΔT_m	99
i. La création d'un hybride	99
ii. La mise en forme des données	99

IV. RESULTATS ET DISCUSSION	101
A. Les organismes producteurs d'EPS.....	107
B. Les organismes producteurs de PHA	108
C. Description et caractérisation partielle d'un exopolysaccharide produit par une bactérie marine, <i>Vibrio neocaledonicus</i> sp. nov, de Nouvelle-Calédonie.....	112
PARTIE III : ÉTUDE DE QUELQUES EPS PRODUITS PAR LES BACTÉRIES DE NOUVELLE-CALÉDONIE.....	113
I. MATERIEL ET METHODES	114
A. Le criblage des souches	114
B. La production des EPS	116
1) Culture en bioréacteur	116
2) Extraction, purification et conditionnement des EPS	116
C. Caractérisation chimique des EPS.....	117
1) Dosages colorimétriques	117
a. Dosage des protéines	117
b. Dosage des oses neutres	118
c. Dosage des acides uroniques	119
d. Dosage des osamines et N-acétyl-osamines	120
2) Détermination de la composition osidique par chromatographie phase gazeuse .	121
3) La chromatographie d'exclusion stérique	122
4) Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	123
5) Analyse par Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)	123
II. RESULTATS ET DISCUSSION.....	124
A. Caractérisation Chimique globale	124
1) La colorimétrie	124
2) L'analyse par Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier.....	125
B. Caractérisation des EPS.....	130
1) Composition glycosidique par chromatographie phase gazeuse	130
2) Masse moléculaire des EPS NC336 et NC470.....	132
3) Résonance Magnétique Nucléaire	133
III. DETERMINATION DE LA CAPACITE DE CHELATION DES METAUX LOURDS PAR QUELQUES EPS PRODUITS PAR DES BACTERIES DE NOUVELLE-CALEDONIE. ETUDE PRELIMINAIRE.	137
A. Matériel et Méthodes.....	138
1) Mode opératoire utilisé pour les expérimentations de chélation.....	138
2) Quantification des ions libres par ICP-AES.....	139
3) Visualisation de la chélation.....	139
B. Résultats et Discussion	140
1) Détermination des capacités de chélation des EPS.....	140
a. Le cuivre	140
b. Le nickel	143
C. Conclusion	147
IV. CONCLUSION DE LA PARTIE III	149

PARTIE IV : ÉTUDE DE QUELQUES PHA PRODUITS PAR DES BACTÉRIES DE NOUVELLE-CALÉDONIE.....	151
I. MATERIEL ET METHODES	152
A. Le criblage des souches	152
1) Mise au point du test de criblage moléculaire pour la détection des bactéries productrices de PHA scl.....	152
a. Principe et méthode	152
b. La mise en place du protocole expérimental	153
2) Test PCR pour la détection des bactéries productrices de PHA mcl.....	154
a. Principe et méthode	154
b. La mise en place du protocole expérimental	154
B. Production des PHA	156
C. Extraction et purification des PHA	157
D. Caractérisations des PHA	157
1) Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ¹ H).....	157
2) Analyse Enthalpique Différentielle (AED).....	157
3) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	158
4) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)	158
II. RESULTATS ET DISCUSSION.....	160
A. Le criblage	160
1) Recherche de bactéries productrices de PHA scl	160
2) Recherche de bactéries productrices de PHA mcl.....	161
B. Production de PHA.....	163
1) Les PHA à courtes chaînes.....	163
2) Les PHA à moyennes chaînes	168
III. CONCLUSION DE LA PARTIE IV	177
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	178
I. LES POLYMERES MARINS DE NOUVELLE-CALÉDONIE	179
A. Les EPS.....	179
B. Les PHA.....	181
II. AUTRES PERSPECTIVES DE VALORISATION: LE CAS DES ANTIBIOTIQUES.....	183
BIBLIOGRAPHIE	186

Liste des figures

Figure 1 : Sites hydrothermaux, fumeurs actifs (Iles Tonga – Sud-ouest du Pacifique).....	31
Figure 2 : Schéma de la formation d'une liaison glycosidique.....	34
Figure 3 : Voie métabolique et enzymes impliquées dans la biosynthèse du xanthane	41
Figure 4 : classification des polymères selon de leurs origines et de leur biodégradabilité	52
Figure 5 : Formule générale d'un poly- β -hydroxyalcanoate.....	54
Figure 6 : Représentation schématique d'une granule d'accumulation des PHA	57
Figure 7 : Les différentes voies de biosynthèse des PHA	60
Figure 8 : Illustration de la voie de biosynthèse du PHB.	61
Figure 9 : Illustration de certains thioester CoA utilisés pour la synthèse des PHA.....	62
Figure 10 : Illustration des interactions possibles entre les voies métaboliques pour la synthèse de PHA.....	63
Figure 11 : Voie de biosynthèse du P(HB-HV)	65
Figure 12 : Les opérons associés aux différentes classes de PHA synthases	66
Figure 13 : Carte des zones de prélèvements durant les prospections de 2010 et 2011.....	77
Figure 14 : Photographie d'une migration des produits de PCR sur gel d'agarose pour vérification de la spécificité et de la pureté de l'échantillon.	91
Figure 15 : Principe de fonctionnement du séquençage, obtention d'un chromatogramme et d'une séquence nucléotidique	94
Figure 16 : Représentation de la courbe de dénaturation de l'ADN avec l'outil de la RT-PCR.	97
Figure 17 : Représentation graphique du T_m en fonction du %G+C incluant la représentation linéaire des tendances et la pente associée.....	98
Figure 18 : Illustration d'un test de mesure du ΔT_m par la représentation de la courbe de dénaturation de l'ADN	100
Figure 19 : Représentation et description des différents phénotypes observés durant la 1ère campagne (a) et la 2ème campagne (b) de bio-prospection.....	102

Figure 20 : Arbre des <i>Vibrio</i> établi à partir d'un concatémère formé des séquences de la sous-unité ribosomique 16S et des gènes de ménage gapA, gyrB, pyrH et topA.....	106
Figure 21 : Arbre phylogénétique des souches productrices d'EPS établi à partir des séquences de la sous-unité ribosomique 16S d'environ 1400 pb.....	107
Figure 22 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences nucléotidiques partielles de la sous-unité ribosomique 16S des souches productrices de PHA scl.	108
Figure 23 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences de la sous-unité ribosomique 16S de la souche NC532 productrice de PHA mcl.	109
Figure 24 : Criblage phénotype des EPS réalisé par comparaison de la croissance et de l'aspect des colonies sur deux milieux (Zobell, Zobell enrichi en glucose).....	115
Figure 25 : Spectres IRTF obtenus pour les échantillons d'EPS NC275 (a), NC282(b), NC359 (c) et NC393 (d).	127
Figure 26 : Chromatogramme CPG des dérivés méthylglycosides O-triméthylsilylés de composés standards	131
Figure 27 : Chromatogramme d'exclusion stérique de l'EPS NC336.	132
Figure 28 : Spectre RMN ¹ H de l'échantillon d'EPS produit par la souche NC336.....	134
Figure 29 : Photographies des échantillons d'EPS ultrafiltrés et lyophilisés après mis en contact avec les solutions de sulfate de nickel (a) et d'acétate de cuivre (b).....	138
Figure 30 : Isothermes de rétention du cuivre par les EPS NC282, NC470, NC359 et NC393.	140
Figure 31 : Représentation linéaire des isothermes de rétention du cuivre par les EPS NC282, NC470, NC359 et NC393.....	141
Figure 32 : Isothermes de rétention du cuivre par les EPS NC359 et NC393.	144
Figure 33 : Représentation linéaire des isothermes de rétention du cuivre par les EPS NC359 et NC393.....	144
Figure 34 : Observation par MEB des 4 EPS avant mise en contact avec le sel de nickel (grossissement : x 200).....	145
Figure 35 : Observation par MEB de l'EPS NC470 après mise en contact avec le sel de nickel. Visualisation de structures sphériques chargées en nickel (grossissement x800).....	146
Figure 36 : Comparaison de l'efficacité de deux couples d'amorces sur dix bactéries marines productrices de PHA scl.	160
Figure 37 : Gel d'agarose obtenu après PCR. Mise en évidence d'une bande à 540 pb permettant d'identifier les isolats producteurs de PHA mcl	162

Figure 38 : RMN ¹ H d'un extrait purifié de PHB produit par la souche NC470 cultivée en présence de glucose.	165
Figure 39 : Spectre RMN ¹ H d'un extrait de P(3HB-co-3HV) (PHBV) pour un ratio HB/HV estimé à 85/15 et produit par la souche NC470 cultivée en présence de glucose (10g.L ⁻¹) et de valérate (3g.L ⁻¹).	166
Figure 40 : Profil AED du PHB et PHBV 85/15 produits par la souche NC470 respectivement en présence de glucose (10 g.L ⁻¹) et dans un mélange glucose (10 g.L ⁻¹) - valérate (3 g.L ⁻¹).	167
Figure 41 : Spectre de fragmentation de l'acide 3-O-triméthylsilyl décanoïque méthyl ester (M= 274).	170
Figure 42 : Spectre de fragmentation d'un dérivé 3-O-acétyl thiométhyl méthyl ester de l'acide 3-hydroxynon-8-énoate (3HN:1Δ8).	172
Figure 43 : Spectre RMN ¹ H du PHA mcl produit par la souche NC532 sur huile de coprah (10 g.L ⁻¹).	173
Figure 44 : Spectre RMN ¹ H du PHOU 23% produit par la souche N532 sur un mélange d'acide octanoïque 3 g.L ⁻¹ et d'acide undécénoïque 0,5 g.L ⁻¹	174
Figure 45 : Profil AED du PHA mcl produit par la souche NC532 cultivé en présence d'huile de coprah.	175

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Liste des principaux sucres présents dans la structure des EPS	37
Tableau 2 : Énumération des EPS les plus couramment retrouvés dans le secteur industriel et de leurs caractéristiques.	45
Tableau 3 : Sélection de monomères entrant dans la composition des PHA.....	55
Tableau 4: Comparatif des propriétés physicochimiques des PHA	69
Tableau 5 : Identification des zones prospectées et des prélèvements associés	77
Tableau 6 : Détermination des optimums de croissance pour les souches retenues à l'issue du criblage des EPS et des PHA	81
Tableau 7 : Énumération détaillée des spécificités concernant les amorces utilisées (a) ainsi que le programme d'amplification PCR (b).....	90
Tableau 8 : Description des différents mélanges à réaliser lors d'une réaction de séquence avec la préparation d'un mix par amorce (a) et détail du programme d'amplification PCR à respecter selon les recommandations du fabricant (b)	92
Tableau 9 : Détermination des Tm de souches Vibrio de référence et énumération des %G+C correspondant à chaque espèce	98
Tableau 10 : Données biochimiques et identification partielle de certaines souches bactériennes.....	104
Tableau 11 : Récapitulatif de la taille des séquences génétiques obtenues pour les isolats appartenant au genre Vibrio	105
Tableau 12 : Résultats du criblage phénotypique réalisé pour la recherche de bactéries potentiellement productrices d'EPS	115
Tableau 13 : Composition globale des EPS par souche (% massique), et rendements de production (g.L ⁻¹).	124
Tableau 14 : Composition glycosidique des EPS déterminée par CPG	130
Tableau 15 : Valeurs de Qmax (mg.g ⁻¹) Kd (mg.L ⁻¹) et R ² obtenus avec le cuivre.	141
Tableau 16 : Capacité de biosorption de différentes biomasses et polymères vis-à-vis du cuivre et du nickel.	142

Tableau 17: Valeurs de Q_{max} ($mg.g^{-1}$) K_d ($mg.L^{-1}$) et R^2 obtenus avec le nickel.	143
Tableau 18 : Mesures spectrales réalisées par microanalyse pour le nickel au sein des EPS	146
Tableau 19 : Valeurs de pH mesurées en fin d'expérimentations de mise en contact des EPS et des solutions métalliques	148
Tableau 20 : Résultats de la production de PHA scl par les souches issues du criblage.....	164
Tableau 21 : Résultats de la production de PHA mcl par la souche NC532.	168
Tableau 22 : Compositions monomériques (mol%) déterminées par CPG-SM des PHA mcl produits par la souche NC532.	171
Tableau 23 : Température de fusion (T_m), de transition vitreuse (T_g) et enthalpie de fusion (ΔH_f) des PHA mcl produits par la souche NC532.	176

Liste des abréviations

ABS : Acrylonitrile Butadiène Styrène

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique.

ADN db : ADN double brin

ATP: Adénosine-5'-TriPhosphate

AU: Acide Uronique

BCA : BiCinchoninic Acid

BSA : Bovin Serum Albumin (sérum albumine de bovin)

AED : Analyse Enthalpique Différentielle)

CoA : Coenzyme A

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Pression

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

CPG-SM : Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

CPS : Capsular PolySaccharide (polysaccharide capsulaire)

DO : Densité Optique (Absorbance)

DSC : Differential Scanning Calorimetry (calorimétrie différentielle à balayage)

ΔH_f : enthalpie de fusion

ΔT_m : différence entre deux températures de fusion

EPS : ExoPolySaccharides

GAG : GlycosAminoGlycanes

HA : Hylaluronic Acid (acide hyaluronique)

HB : HydroxyButyrate

HD : HydroxyDécanoate

HDD : HydroxyDoDécanoate

HHp : HydroxyHeptènoate

HHx : HydroxyHexanoate

HN : HydroxyNonènoate

HO : HydroxyOctanoate

HPSEC : High Pressurised Size Exclusion Chromatography (chromatographie d'exclusion stérique à haute pression)

HUD : HydroxyUnDécènoate

HV : HydroxyValérate

IRTF : Spectrométrie Infra Rouge à Transformée de Fourier

ICP-AES : Spectromètre d'Émission Atomique Couplée à un Plasma Induit

McF : McFarland (unité standard de turbidité)

MEB : Microscope à Balayage Électronique

MLST : Multi Locus Sequence Typing

ON : Oses Neutres

ORF : Open Reading Frame (Cadre ouvert de lecture)

PA: PolyAmide

Pb : Paire de Base

PBS : PolyButyrate Succinate

PBSAT : PolyButylène Succinate-co-Adipate Terephtalate

PBSL : PolyButyrate Succinate-co-Lactate

PBT : PolyButyrate Terephtalate

PCL : PolyCaproLactone

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : PolyEthylène

PET : PolyEthylène Tetraphtalate

PLA : PolyLactic Acid (polylactate)

P3HA : Poly-3-HydroxyAlcanoates

PHA scl : PHA short chain length (PHA à courtes chaines)

PHA-mcl : PHA medium chain length (PHA à moyennes chaînes)

PHA lcl : PHA long chain length (PHA à longues chaînes)

PHB : Poly (3-hydroxybutyrate)

PHBHV : Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate)

P3HB4HB : Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)

PHO : Poly (3-hydroxyoctanoate)

PHOU : Poly (3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundécénoate)

PP : PolyPropylène

ppm : Parties Par Millions

PUR : PolyUrétane

PVC : PolyVinyl Chloride

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

rpm : rotation par minute

RT-PCR : Real Time PCR (PCR en temps réel)

SEC : Size Exclusion Chromatography (chromatographie d'exclusion stérique)

Tg : température de transition vitreuse

Tm : température de fusion

Tor : Température Optimale de Renaturation

UFC : Unité Formant une Colonie

UV : Ultra-Violet

Contexte de l'étude

I. Présentation du sujet :

Le sujet qui va vous être présenté a pour objectif de valoriser le patrimoine naturel de la Nouvelle-Calédonie par l'étude et la caractérisation de la ressource microbienne marine capable de produire des polymères naturels d'intérêt biotechnologique. Les polymères sont des produits utilisés pour une multitude d'applications dans de nombreux secteurs et font l'objet d'études de plus en plus poussées, du fait de la demande toujours croissante de la part des industriels en quête de nouvelles molécules originales.

Ce travail de thèse a débuté en octobre 2010 sous l'impulsion de deux instituts, l'Institut Français pour le Recherche et l'Exploitation de la Mer (IFREMER) et l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) sous la responsabilité et la direction du Dr Christelle Simon-Colin pour le Laboratoire de Biotechnologie des Molécules Marines (LBMM IFREMER Brest) et du Dr Myrielle Dupont-Rouzeyrol pour l'Unité de recherche et d'Expertise Dengue et Arbovirose (URDA-IPNC). Ce sujet de recherche doctorale s'intitule : « Bio-prospection et biodiversité de micro-organismes des milieux extrêmes des lagons de la Nouvelle-Calédonie : Premières évaluations du potentiel de production de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique ». Les biopolymères dont il est question dans ce sujet sont les exopolysaccharides (EPS) et les polyhydroxyalcanoates (PHA). Pour se faire, ce travail a fait appel à de nombreuses approches scientifiques : microbiologie, chimie structurale, biochimie ou encore biologie moléculaire.

Cette étude doctorale a été menée parallèlement au projet «Bio-prospection et biodiversité de micro-organismes des milieux extrêmes des lagons de la Nouvelle-Calédonie. Recherche, Caractérisation et Valorisation de nouvelles molécules d'intérêt biotechnologique » financé par le Secrétariat d'Etat à l'Outre-Mer (2009-2011, 2012-2014), et mené conjointement par les équipes de l'IFREMER (Brest, Nouméa) et de l'IPNC. Ce projet visait à constituer une collection de micro-organismes issus des milieux intertidaux de la Nouvelle-Calédonie et à valoriser les molécules issues de ces micro-organismes. Sous-jacent

à la mise en place de cette collection, un autre objectif de cette collaboration était de transférer le savoir-faire du LBMM pour la recherche, la production et la caractérisation des biopolymères bactériens, vers la Nouvelle-Calédonie afin d'encourager le développement des biotechnologies marines sur le territoire.

D'autre part, cette thématique a bénéficié du contexte économique favorable de la Nouvelle-Calédonie qui offre de belles perspectives pour le développement des biotechnologies en raison de ses engagements quant aux perspectives de recherche et de valorisation de la ressource marine (<http://www.nouvelle-caledonie.gouv.fr>). Les accords-cadres récemment signés (9 août 2012) placent, effectivement, le soutien, le développement et l'innovation dans le domaine de la valorisation des ressources biologiques marines avec l'aspect des biotechnologies marines parmi les secteurs prioritaires. Ainsi, la Nouvelle-Calédonie bénéficiera de la présence effective d'un tissu de jeunes entreprises innovantes en biotechnologie qui constitueront une source d'innovations majeures pour le secteur industriel.

II. Les objectifs de l'étude

Plusieurs grands objectifs ont été déterminés au début de cette étude :

- En premier lieu, il s'agissait d'établir une collection de micro-organismes prélevés au niveau des zones intertidales atypiques/extrêmes de la Nouvelle-Calédonie.
- Ensuite, de rechercher, au sein de cette collection, des isolats capables de produire des polymères d'intérêt, en particulier les EPS et PHAs avec la mise en place de différentes méthodes de criblage.
- Enfin, de produire des polymères bactériens via l'utilisation d'outils biotechnologiques, réaliser la caractérisation chimique et rechercher des pistes de valorisation.

III. Présentation des différentes parties abordées

Ce mémoire de thèse débutera par une revue bibliographique présentant le milieu marin en tant que ressource de substances naturelles d'intérêt pour l'Homme. Puis la thématique des « biotechnologies bleues » est traitée ainsi que les perspectives prometteuses qui y sont associées. Cette première partie fera également l'état de synthèses bibliographiques pour les deux types de polymères bactériens qui seront étudiés : les EPS et les PHAs. Ces synthèses vont regrouper différents éléments de la découverte de ces structures aux applications en passant par les voies de synthèse et à la caractérisation chimique.

La seconde partie présentera la Nouvelle-Calédonie et ses écosystèmes, ce qui permettra de faire un focus sur la création d'une banque d'isolats avec les étapes des prospections, la mise en collection et l'identification des micro-organismes bactériens. Les techniques d'identification des souches constitueront l'essentiel des informations qui vous seront présentées au travers des descriptions phénotypiques, biochimiques et l'utilisation des outils et procédés en biologie moléculaire.

La troisième partie traitera des exopolysaccharides (EPS) bactériens avec en premier lieu les méthodes mises en place pour le criblage des bactéries capables de produire ces molécules, les techniques de fermentation, et de traitement des échantillons. Dans un second temps les techniques d'analyse chimique (colorimétrie, IRTF, CPG, RMN...) seront développées. Enfin, une étude préliminaire portant sur la capacité de chélation de certains EPS vis-à-vis de quelques métaux viendra clôturer cette partie avec une discussion portant sur des perspectives de valorisation.

La quatrième partie s'intéressera à la seconde catégorie de polymères bactériens traités dans cette thèse : les polyhydroxyalcanoates (PHA). Cette thématique débutera par la description des outils utilisés pour le criblage par biologie moléculaire des souches productrices de PHAs. Seront ensuite présentés les protocoles relatifs à la production des PHAs par fermentation bactérienne, l'extraction ainsi que la caractérisation chimique de ces polymères.

En conclusion, un bilan général reprendra les principaux résultats obtenus dans cette étude et les perspectives d'ores et déjà envisageables quant à la valorisation potentielle des

EPS et PHAs d'origine néo-calédonienne. Ce mémoire s'achèvera par une tout autre perspective de valorisation avec les potentialités de certaines bactéries marines de la collection pour la production d'antibiotiques.

PARTIE I : Revue Bibliographique

I. Aspects de la Biotechnologie Marine

A. Les différentes couleurs des biotechnologies

La Biotechnologie est au carrefour entre le vivant et la technologie, l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE) définit les biotechnologies comme « l'application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services ».

La biotechnologie a une connotation assez moderne, mais en réalité, les techniques de biotechnologie existent et sont utilisées depuis longtemps. On retrouve parmi elles la vinification, la brasserie, ou encore la fabrication et l'affinage du fromage. On parle alors familièrement de « biotechnologies traditionnelles » car les concepts liés à l'intervention des micro-organismes étaient encore inconnus. Le terme de biotechnologie a été employé pour la première fois en 1919 par Karl Ereky, ingénieur agricole hongrois dans un ouvrage (Ereky 1919) portant sur la valorisation des déchets fermiers par des voies de transformation biologique (Fári and Kralovánszky 2006). Actuellement les technologies ayant évolué, plusieurs disciplines scientifiques telles que la microbiologie, la biochimie, la biophysique, la génétique, la biologie moléculaire ou encore l'informatique ont permis de passer à de nouvelles générations de biotechnologies classées selon un code couleur en fonction des domaines d'applications :

- Les **biotechnologies vertes** sont liées à l'agriculture, comprenant la domestication de certaines variétés de plantes (culture in vitro) ou encore l'utilisation des transgénèses végétales.
- Les **biotechnologies rouges** dont les applications concernent le domaine de la santé (production d'antibiotiques, thérapie génique).
- Les **biotechnologies blanches** qui, dans un contexte de développement durable et d'utilisation de matières premières renouvelables en substitution du carbone d'origine fossile, proposent l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés ou non pour la

production de composés d'intérêt. On retrouve par exemple des enzymes (catalyseur de réactions), substances chimiques pour l'industrie alimentaire (acide lactique, arômes), biocarburant (bioéthanol), ou encore des produits domestiques (lessives)

- Les **biotechnologies jaunes** rassemblent toutes les biotechnologies se rapportant à la protection de l'environnement, au traitement ou à l'élimination de polluants (ici par exemple : la bioremédiation ou la biodétoxification,...).
- Les **biotechnologies bleues** visent à valoriser le potentiel des mers et des océans. C'est un domaine en pleine expansion dont les produits intéressent de nombreux secteurs industriels (pharmaceutique, alimentaire, cosmétique, environnemental, et bien d'autres encore).

Selon le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie, le marché des biotechnologies marines connaît une croissance de 10% par an et se présente comme l'un des secteurs les plus prometteurs en matière de création d'emplois et de richesse (<http://www.developpement-durable.gouv.fr/Biotechnologie-marine-quels.html>).

B. Valorisation de la ressource marine : le passé et l'avenir de notre société

1) La valorisation des organismes marins

Les espaces marins recouvrent près des deux tiers de la surface du globe et abritent la **plus grande biodiversité** de notre planète, dont seule une infime partie a été découverte à ce jour. En outre, on estime que **95% de la biosphère réside dans les océans** (Davidson 1995). Les espaces marins représentent une ressource importante de vie sur notre planète, et sont exploités depuis longtemps par l'Homme. Déjà, au paléolithique, 30% des ressources protéiques consommées par ce dernier étaient issues de la **pêche en mer**. Les espaces marins ont ainsi attiré et permis l'émergence de nombreuses civilisations. Parmi elles, on retrouve notamment des civilisations polynésiennes qui, par leurs connaissances des milieux marins et de ses ressources, ont pu peupler une grande partie de l'Océan Pacifique (Salvat 1982). De nos jours, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) estime que les ressources protéiques issues de la mer (pêche et aquaculture) génèrent mondialement 15% des apports en protéine animale pour 2,9 milliards d'individus.

Quant aux **ressources végétales marines**, elles ont également fait l'objet d'exploitations humaines depuis des siècles, en de nombreuses régions littorales du monde que ce soit dans le régime alimentaire humain (Ambrose et al. 1997) ou animal (Balasse et al. 2006). La ressource alimentaire végétale marine est dans certaines régions du monde l'une des seules sources en fibre, notamment dans les régions polaires où les habitants y trouvaient un complément **alimentaire** nécessaire à leur mode de vie (Robbe and Hladik 1988). Certaines cultures du monde ont même élevé la consommation des végétaux marins au rang de met de choix, c'est le cas dans les pays asiatiques et plus particulièrement au Japon (1^{er} consommateur mondial de nori = algue du genre *Pyropia*), la Corée ou encore la Chine. Cette alternative aux ressources terrestres a été encouragée par des périodes de disettes, l'absence

d'étendues cultivables, la proximité d'une ressource abondante jusqu'à devenir une part intégrante de la culture locale.

Concernant le domaine de la **santé**, les premières recherches sur la **valorisation des substances issues du milieu marin** ont débuté dans les années 50 avec un engouement grandissant pour cette nouvelle source de molécules innovantes. Les applications dans le domaine de la santé sont très variées, en tant que molécules antibiotiques, antimitotiques, anti-inflammatoires, antitumorales, antiparasitaires, antivirales (VIH), ou encore dans le traitement de la maladie de Parkinson (de Nys and Steinberg 2002; Ledoux and Turner 2002; Donia and Hamann 2003; Pulz and Gross 2004; Kim and Mendis 2006; Kuwada et al. 2006; Wang 2006; Rasmussen and Morrissey 2007; Tan 2007). Ces molécules sont issues d'une grande variété d'organismes marins tels que les éponges, bactéries, champignons, cnidaires, algues, mollusques, ou encore échinodermes (Munro et al. 1999; Donia and Hamann 2003; Smit 2004; Molinski et al. 2009). Au total, au cours des 40 à 50 dernières années, plus de 12 000 nouvelles molécules actives ont été recensées pour les 300 000 espèces (animales, végétales et bactériennes) décrites à ce jour (Donia and Hamann 2003).

La valorisation de la ressource marine trouve également des débouchés dans le domaine de l'**agriculture**. Les vertus fertilisantes des algues étaient déjà connues et utilisées par les Romains sous forme de compost. Les algues marines sont utilisées commercialement depuis une soixantaine d'années comme substitut à la fertilisation chimique dans l'amendement des sols (Craigie 2011). L'utilisation de ce type de ressource présente l'avantage d'être économiquement compétitif, renouvelable, abondante et respectueuse des micro-organismes du sol (champignons mycorhisiens, symbiotes des racines de plantes) (Kuwada et al. 2006)

2) Le cas des bactéries marines

Plusieurs études ont montré le fort potentiel des micro-organismes marins ainsi que l'extraordinaire diversité des composés qui en sont issus (Blunt et al. 2006; Rasmussen et al. 2007; Freitas et al. 2012). Les premières études d'envergure n'ont débuté que vers le milieu

du siècle dernier, tout porte à croire que de nombreuses découvertes restent à venir et que les océans présentent une ressource naturelle avec de grandes perspectives d'avenir.

Un domaine qui reste encore peu étudié est celui de l'étude et de la valorisation des micro-organismes marins et plus particulièrement **des bactéries marines**. Les bactéries marines occupent une place importante dans l'écologie marine et colonisent de nombreux environnements, aussi bien en surface que dans les fonds abyssaux, des zones hydrothermales aux eaux polaires glacées (Nichols et al. 2005a; Poli et al. 2010). Elles font partie des formes de vie les plus anciennes et sont souvent le premier maillon de la chaîne trophique dans les milieux extrêmes (Minic et al. 2006). Ces organismes doivent leur survie à leurs **extraordinaires facultés adaptatives** via notamment le développement de nouvelles voies métaboliques (synthèse d'enzymes) ou encore la synthèse de structures de protection (polymères).

Depuis les années 80, les innovations techniques et technologiques ont permis l'émergence de procédés permettant la culture, l'étude, la caractérisation et la valorisation des composés issus des bactéries marines. Des développements industriels ont émergé de ces recherches, notamment l'utilisation d'**enzymes** thermostables synthétisées par des bactéries hyperthermophiles qui trouvent une utilisation en biologie moléculaire (polymérase) ou en agroalimentaire capables de lyser des polymères tels que l'amidon ou la cellulose. D'autres enzymes permettent de cliver des molécules complexes tels que le xylane (utilisé comme additif en agroalimentaire), la chitine, les protéines (hydrolyse de la kératine) (Niehaus et al. 1999), ou présentent des fonctions intéressantes (l'alcool déshydrogénase, glucose isomérase, estérase, etc) pour l'industrie.

D'autres études ont montré la production, notamment par des bactéries symbiotes d'éponges, de molécules bioactives innovantes à caractère **antimicrobien**, qui peuvent trouver une application dans les secteurs de la santé ou de l'environnement. On retrouve également des molécules **antisalissures** (antifouling) (Holmström et al. 2002), avec des applications potentielles en milieu hospitalier. En effet, le développement de biofilm bactérien peut être à l'origine des résistances bactériennes et de l'encombrement des cathéters (Wilson et al. 2011). D'autres molécules issues des bactéries marines ont montré des activités antitumorales et antivirales (Davidson 1995).

Les **polymères** produits par les bactéries marines connaissent également un fort développement dans **de nombreux secteurs industriels** : **alimentaire**, en tant qu'agent de texture, gélifiant, conservateur ...(Decho 1990; Rasmussen et al. 2007; Bleau et al. 2010; Badel et al. 2011; Freitas et al. 2012) ; **cosmétique**, pour leurs propriétés gélifiantes, hydratantes, cicatrisantes, antirides (Sutherland 1998; Arias et al. 2003; Yamada and Kawasaki 2005; Liu et al. 2011; Le Costaouëc et al. 2012); **chimie**, permettant par exemple de réduire la quantité d'additif pour le plastique, pour la production de catalyseurs ou de lubrifiants... (Gavrilescu and Chisti 2005); **environnement**, comme antifouling, pour la bioremediation...(Kim et al. 2011; Guezennec et al. 2012); **agriculture**, pour la fabrication de film de protection des cultures, la libération contrôlée de pesticides, la phyto élévation...(Colegrove 1983; Ortmann et al. 2006; Philip et al. 2007; Ghormade et al. 2011); **santé**, en tant qu'immunostimulant, cicatrisant ...(Arias et al. 2003; Collic-Jouault et al. 2004; Mayer and Hamann 2004; Khan et al. 2007) ou encore dans le domaine des **nanotechnologies** (Weiss et al. 2006; Kashima and Imai 2012).

La thématique des bactéries marines est donc en pleine expansion et touche des domaines d'applications très variés. Les découvertes réalisées au cours des deux dernières décennies laissent entrevoir des perspectives prometteuses dans l'application et la valorisation des composés bactériens. De plus, les avancées scientifiques dans le domaine des biotechnologies rendent aujourd'hui possible la production à grande échelle des bactéries et des molécules associées.

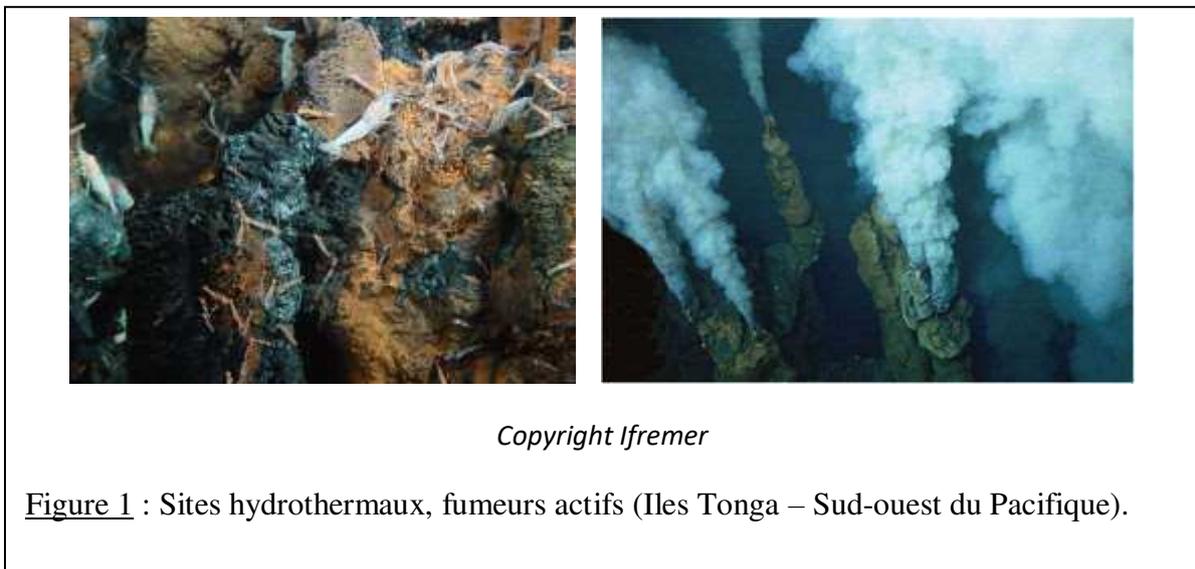
C. Intérêts biotechnologiques des polymères bactériens

L'étude des **polymères d'origine microbienne** n'est pas une discipline récente. Les premières observations décrites des polymères bactériens furent effectuées par le savant néerlandais Antoni Van Leeuwenhoek, précurseur des disciplines qui deviendront la biologie cellulaire et la microbiologie, au XVIIe siècle. Il réalise une observation où il décrit la présence « d'animalcules » sur la plaque dentaire (Donlan and Costerton 2002). Il s'agissait là de la première description d'un biofilm bactérien. Au XIXe siècle, c'est à Louis Pasteur, chimiste et physicien pionnier de la microbiologie, de décrire la présence de dextran dans du vin (Pasteur 1861), ce **polysaccharide** étant produit par la bactérie *Leuconostoc mesenteriodes*. En 1886, on découvre que les bactéries sont également capables de synthétiser de la cellulose (Brown 1886). Ce sont les premières mises en évidence d'**exopolysaccharides**. Vient ensuite la découverte, en 1887, des **polyamines** produites par des cyanobactéries. En 1926, le biologiste Maurice Lemoigne décrit des produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique aussi appelés **polyhydroxybutyrate** (PHB) lors de ses recherches sur la bactérie *Bacillus megaterium*. À partir du milieu du XXe siècle, un grand nombre de polymères bactériens ont été découverts tels que l'alginate (Linker and Jones 1966), le xanthane (Lilly et al. 1957), les poly- γ -glutamates, ou encore les polyphosphates (Sall et al. 1958).

Plus récemment, disposant de nouveaux moyens d'exploration, la communauté scientifique s'est intéressée aux **organismes marins, et notamment aux micro-organismes vivant dans des environnements hostiles ou atypiques** (abysses, lacs salés, sources hydrothermales...). En effet, pour survivre et se développer dans ces conditions environnementales extrêmes, ces micro-organismes ont mis en place des stratégies d'adaptation surprenantes, notamment au niveau de leurs voies métaboliques ou encore la synthèse de molécules tout à fait originales, parmi lesquels des biopolymères.

La découverte des premiers micro-organismes extrêmophiles contredisait certains principes de base de la microbiologie. En effet, depuis Louis Pasteur, il était admis que tout organisme bactérien exposé à des températures comprises entre 80° et 100°C n'y survivait pas. La découverte par Thomas Brock, en 1972, de colonies bactériennes vivant au niveau d'une

source chaude dans le parc National de Yellowstone en milieu acide à des températures comprises en 75 et 85°C (Brock et al. 1972) allait bouleverser les concepts établis et être le point de départ de nouvelles perspectives de recherches tournées vers les milieux atypiques et extrêmes. Plusieurs zones extrêmes du globe ont alors été prospectées. C'est le cas, en 1977, des **sources hydrothermales profondes** sondées pour la première fois à bord du sous-marin « Alvin ». Contre toute attente, ces lieux où la température, la pression et l'absence de lumière n'apportaient pas les conditions les plus propices à l'émergence de la vie se sont révélés être des écosystèmes riches et complexes, dont la source première en matière organique repose sur la présence de bactéries aux alentours des cheminées hydrothermales (Guezennec 2004) (Figure 1).



Les études des **zones polaires** ont également mis en évidence la présence de micro-organismes représentant une part importante de ces écosystèmes (Sullivan and Palmisano 1984; Krembs et al. 2002).

S'est alors posée la question des stratégies adaptatives développées par ces micro-organismes pour survivre à ces conditions extrêmes. Ces adaptations sont d'ordre métabolique (synthèse enzymatique) et physiologique (mise en place de structures de réserve, synthèse de composés protecteurs...). De plus, des études menées sur ces bactéries de l'extrême ont mis en évidence leur formidable potentiel pour une valorisation dans le domaine des biotechnologies (Guezennec 2002) et plus particulièrement pour **leur faculté à produire des polymères de composition originale**. L'IFREMER a ainsi joué un rôle de pionnier dans ce

domaine en constituant une formidable collection de micro-organismes isolés au niveau des sources hydrothermales profondes et qui ont été étudiés sous plusieurs aspects (écologie, synthèse enzymatique, métabolites secondaires, etc.). Le Laboratoire de Biotechnologies et Molécules Marines (LBMM) de l'IFREMER s'intéresse à la recherche, la caractérisation et la valorisation des molécules d'intérêt biotechnologique, produites en conditions de laboratoire, par des micro-organismes issus de milieux atypiques. Parmi ces molécules, le LBMM s'intéresse plus particulièrement aux EPS et PHAs.

S'agissant des polymères, il est important de noter que les polymères actuellement utilisés dans les secteurs industriels sont majoritairement issus de la chimie et/ou à partir de ressource fossile. Hors, au regard de la raréfaction du pétrole et de la prise de conscience vis-à-vis de l'environnement, de nouvelles directives en matière environnementale (**BIOCIDES** (1998) **Directive REACH** : enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances Chimiques (2007)) et ont été mises en place et plaident aujourd'hui pour la substitution des produits de synthèse issus de la chimie par des bioproduits issus de ressources renouvelables. **Les biopolymères d'origine naturelle**, de par leur diversité de structure, et leurs propriétés spécifiques (**biosynthèse, biodégradabilité, biocompatibilité, biosourcé**, propriétés rhéologiques, chimiques...) se présentent comme une alternative biotechnologique intéressante permettant de répondre à tout ou partie des problèmes liés à l'utilisation des produits de synthèse (Gavrilescu and Chisti 2005). Plus particulièrement, **la production de biopolymères par fermentation bactérienne** présente des avantages par rapport à celle de leurs homologues extraits d'algues ou de plantes. En effet, la production de polymères bactériens est aisément contrôlée en conditions de laboratoire (Wingender et al. 1999). Ainsi elle n'est pas soumise aux aléas climatiques, écologiques, politiques ou géographiques pour l'approvisionnement de la matière première, et n'a aucun impact environnemental (pollution par les engrais) ou écologique (développement de la monoculture, réduction de la biodiversité). D'autre part, la production de polymères par fermentation bactérienne permet d'assurer une production intensive et de qualité. De plus, les installations sont réduites (fermenteurs) et permettent de réaliser des productions en continu. Ces paramètres garantissent une constance dans la production aussi bien en ce qui concerne le rendement que la qualité. Enfin, concernant la production d'exopolysaccharides, les techniques d'extraction et de purification sont simplifiées, écartant ainsi l'utilisation de produits polluants, ce qui permet de classer ces produits comme naturels et respectueux de l'environnement.

Les travaux initiés au LBMM dès 1987 à partir de la collection de **bactéries hydrothermales** ont abouti à la découverte de nouveaux micro-organismes capables de synthétiser des EPS originaux. Partant de ces travaux associant conditions de vie extrêmes à la synthèse de molécules innovantes, de nouvelles études ont porté sur d'autres environnements atypiques. **En Polynésie Française**, dans une optique de découverte et de valorisation de polymères d'intérêt, des prospections ont ainsi débuté sur des zones atypiques intertidales plus accessibles, parmi lesquels des **tapis microbiens** présents sur certains atolls. Ces tapis microbiens sont fortement soumis aux variations de salinité ainsi qu'à une intense irradiation solaire. Ils s'organisent en une structure stratifiée, de quelques centimètres à un mètre d'épaisseur, composée de plusieurs communautés microbiennes organisées en couches successives en réponse aux gradients de lumière, d'oxygène dissous, de potentiel redox, de sulfures et de pH (Mao et al. 2001; Rougeaux et al. 2001; Guezennec et al. 2011). Une large collection de micro-organismes a ainsi été constituée et a fait l'objet d'un criblage afin de mettre en évidence l'aptitude de ces bactéries à produire des polymères. Les travaux réalisés à ce jour ont mis en évidence **un fort potentiel biotechnologique au niveau de la production de molécules intéressantes (EPS, PHA, métabolites secondaires, pigments...)** synthétisées par ces bactéries (Rougeaux et al. 2001; Moppert et al. 2009; Guezennec et al. 2011)

A l'instar des travaux décrits précédemment, une approche similaire a été menée en **Nouvelle-Calédonie** au cours de cette étude doctorale, et a porté plus spécifiquement sur la recherche de bactéries capables de produire, en condition de laboratoire, des EPS et des PHA.

II. Les ExoPolySaccharides (EPS)

A. Description générale des EPS

Un polysaccharide est défini comme un enchaînement d'unités monosaccharidiques reliées par des liaisons glycosidiques. La formation d'une liaison glycosidique résulte de la condensation entre la fonction OH du carbone anomérique du premier monosaccharide et une fonction OH du résidu suivant (Figure 2).

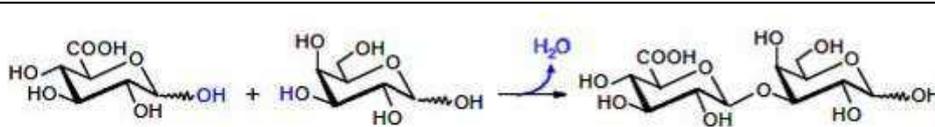


Figure 2 : Schéma de la formation d'une liaison glycosidique.

Les polysaccharides sont les macromolécules les plus abondantes sur terre et dans les océans. Ils peuvent avoir différentes origines : procaryote (bactéries) ou eucaryote (animaux, plantes supérieures, champignons, levures, algues).

Les bactéries synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés en trois grands groupes selon leur localisation dans la cellule (Sutherland 2001) : (i) Le premier groupe rassemble les polysaccharides du cytosol, ils servent de source de carbone et d'énergie à la cellule; (ii) le second groupe concerne les constituants de la paroi tels que les acides téichoïques et les peptidoglycanes; (iii) le troisième groupe réunit les polysaccharides élaborés par la cellule et secrétés dans le milieu, appelés polysaccharides extracellulaires ou exocellulaires qui peuvent être soit liés de façon covalente à la cellule formant une capsule (polysaccharides capsulaires (CPS)) soit relargués dans le milieu environnant sous forme de « slim » sans association manifeste avec la cellule (Exopolysaccharides EPS). **Ces EPS font l'objet de notre étude.**

B. Composition chimique

Les polysaccharides sont constitués de l'enchaînement **d'unités monosaccharidiques** dont la variété stéréochimique et les possibilités de liaisons entre résidus donnent naissance à une grande diversité de structures. En général, les exopolysaccharides bactériens sont composés **d'une unité de répétition** comptant 2 à 8 résidus osidiques (mais pouvant aller jusqu'à 12) organisés de manière linéaire ou ramifiée. La répétition de cette unité définit le degré de polymérisation de l'EPS, c'est-à-dire son poids moléculaire, et l'indice de polydispersité caractérise l'homogénéité de la distribution des chaînes. Les résidus glycosidiques constitutifs de l'unité répétitive peuvent être des oses neutres, des acides uroniques ou des hexosamines qui confèrent alors au polysaccharide un caractère plus ou moins polyélectrolytique.

La structure primaire des EPS bactériens se caractérise également par la présence et la nature **des substituants**. Ces composés non osidiques sont de type organique (pyruvate, lactate, succinate, acétate...) ou inorganique (sulfate, phosphate) et sont liés de façon covalente aux résidus glycosidiques. Les groupements de types acétate et pyruvate sont les composés organiques plus courants chez les EPS bactériens et les phosphates sont les groupements inorganiques les plus fréquents, en particulier chez les bactéries à Gram positif. Bien que les sulfates soient très communs au sein des polysaccharides d'algues et de cyanobactéries, ils sont généralement plus rares chez les EPS bactériens, à l'exception de quelques souches décrites récemment (Mancuso Nichols et al. 2004; Roger et al. 2004).

Les caractéristiques structurales des EPS concernent donc principalement la nature de l'unité répétitive et son degré de polymérisation. Elles régissent les propriétés physico-chimiques de chaque EPS puisque celles-ci sont liées à la nature des résidus constitutifs, à leur enchaînement, à la longueur et au degré de ramification du polymère et à la présence/nature de substituants et confèrent ainsi à chaque EPS des propriétés spécifiques (chimiques, rhéologiques, biologiques...) leur offrant des applications dans différents secteurs des biotechnologies.

Les résidus glycosidiques peuvent être de plusieurs types. Dans l'état actuel des données disponibles sur l'élucidation structurale des EPS, on retrouve couramment certains composés osidiques types parmi lesquels :

- Les oses neutres avec en premier lieu, le glucose, le galactose et le mannose et en second lieu le fructose et le rhamnose.
- Les oses acides de types uroniques avec le l'acide glucuronique et galacturonique essentiellement.
- Les oses couplés à des groupements amines (-NH₂) souvent N-acétylés sous forme de N-acétyl-glucosamine ou N-acétyl-galactosamine.

Les EPS peuvent également se retrouver couplés à des structures telles que des composés organiques de type ester, lactate (Cescutti et al. 2011), pyruvate (Read and Costerton 1987), succinate (Troyano et al. 1996), acétate ou encore des composés inorganiques comme le phosphate (Robijn et al. 1995) ou le sulfate (Moppert et al. 2009) ([Tableau 1](#)).

La diversité des composés osidiques, des liaisons structurales, des configurations, des tailles des polymères génère une variation infinie de combinaisons et d'applications possibles chez les EPS.

Tableau 1 : Liste des principaux sucres présents dans la structure des EPS (Cescutti 2009)

Oses neutres	Pentose (5 C)	Ribose Arabinose Xylose	
	Hexose (6 C)	Glucose Mannose Galactose Fructose Rhamnose Fucose	
Oses chargés	Osamines	Glucosamine Galactosamine	Souvent N-acétylé
	Acides uroniques	A. Glucuronique A. Galacturonique A. Guluronique A. Mannuronique	

Plus rarement on peut retrouver les oses suivants :

2-acétoamido-2,6-didéoxygalactose, acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonic, acide N-acétylneuramicinique, acide 2-acétamido-2-déoxy-guluronique, acide 2-acétamido-2-déoxy-mannuronique, sucres O-méthylés.

Substituants possibles :

N- et O-acétyl: ketal pyruvate, acide phosphorique (avec liaison diester).

Succinates, acides aminés, glycérol, ribitol, lactate.

C. Rôle physiologique

Les EPS sont synthétisés par de nombreuses bactéries, Gram positif ou négatif. Ils jouent un rôle important dans la physiologie de la cellule et l'investissement énergétique pour la synthèse des EPS est tel que certaines espèces dépensent jusqu'à 70% de leur énergie pour synthétiser ces structures (Wolfaardt et al. 1999). Pour d'autres espèces, l'incapacité à synthétiser des EPS inhibe fortement leur capacité à proliférer. Les études menées sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Vibrio cholerae* ont montré une baisse significative de la prolifération des souches ainsi que l'incapacité à activer certains gènes (notamment ceux impliqués dans leur pathogénicité) chez des mutants ayant perdu leur aptitude à synthétiser des EPS (Wai et al. 1998; Sauer et al. 2002).

On attribue plusieurs fonctions à ces substances dont la principale est d'assurer l'**adhésion** (fixation irréversible) des bactéries sur les surfaces et de favoriser le développement d'un voile bactérien ou « biofilm », en concentrant et en piégeant la matière organique et les oligo-éléments nécessaires à la croissance bactérienne (Logan and Hunt 1987; Decho 1990; Decho and Herndl 1995). En sus de la formation de biofilms bactériens, les EPS jouent également un rôle important dans les **processus d'interaction et de reconnaissances cellulaires**. Cette architecture polysaccharidique, synthétisée par les bactéries, favorise la présence d'une grande quantité de composés cellulaires parmi lesquels des protéines extracellulaires permettant l'activation synchronisée de certains gènes (de défense, enzymes de lyse, etc.) par l'ensemble de la population bactérienne. La transmission des messagers chimiques se fait par l'intermédiaire de vésicules membranaires pouvant véhiculer des informations (enzyme, acides nucléiques) grâce à cette matrice et se fixer sur des récepteurs d'autres individus de la colonie (Flemming and Wingender 2002; Schooling and Beveridge 2006).

Les EPS jouent également **un rôle protecteur** pour les bactéries : ils forment un matériel visqueux offrant de nombreux avantages parmi lesquels la formation d'un milieu tamponné protégeant la colonie des facteurs abiotiques pouvant être létaux (variations de températures, pH, salinités, les fortes expositions aux UV, aux métaux lourds, etc.)(Otero and Vincenzini 2003). Cette gangue gélatineuse constitue également une protection contre la dessiccation et la prédation par certains protozoaires et virus (Beech and Tapper 1999; Ozturk et al. 2009) ou

encore pour contrer le système immunitaire des hôtes infectés, dans le cas des pathogènes (Schwarzmann and Boring 1971).

La présence d'EPS est aussi fréquemment associée à **la résistance des bactéries aux antibiotiques** : cet aspect rejoint en partie celui évoqué précédemment où les bactéries utilisent le biofilm produit comme milieu tamponné pour limiter l'action des antibiotiques (O'Toole et al. 2000). Cette résistance, initialement uniquement d'ordre physique, conduit à une adaptation génétique permettant aux bactéries de réduire leurs sensibilités aux antibiotiques (Stewart and William Costerton 2001). Ce phénomène de résistance est par ailleurs à l'origine de nombreux problèmes dans le milieu hospitalier.

Enfin, associées aux conditions environnementales, des études portant sur des bactéries isolées des milieux atypiques ont montré la synthèse d'EPS et plus particulièrement la structure chimique de ces EPS peut être considérée comme une adaptation/réponse à l'environnement. Ainsi, les environnements extrêmes tels que les océans glacials ont permis de mettre au jour le rôle cryoprotecteur de certains EPS, ou encore leur pouvoir de rétention vis-à-vis de microéléments tels que le fer (Krembs et al. 2002; Junge et al. 2004). L'étude des souches hydrothermales vivant à proximité des sources hydrothermales profondes d'où se dégagent de fortes teneurs en métaux lourds ont révélé la présence de bactéries produisant des EPS présentant de fortes capacités de rétention des métaux (Jeanthon and Prieur 1990).

Des études menées sur des zones atypiques en Polynésie Française ont également montré le rôle important des EPS dans le maintien des communautés de micro-organismes présents dans les écosystèmes formés au sein de tapis microbien (mare à « kopara ») (Mao et al. 2001; Rougeaux et al. 2001; Richert et al. 2005; Moppert et al. 2009).

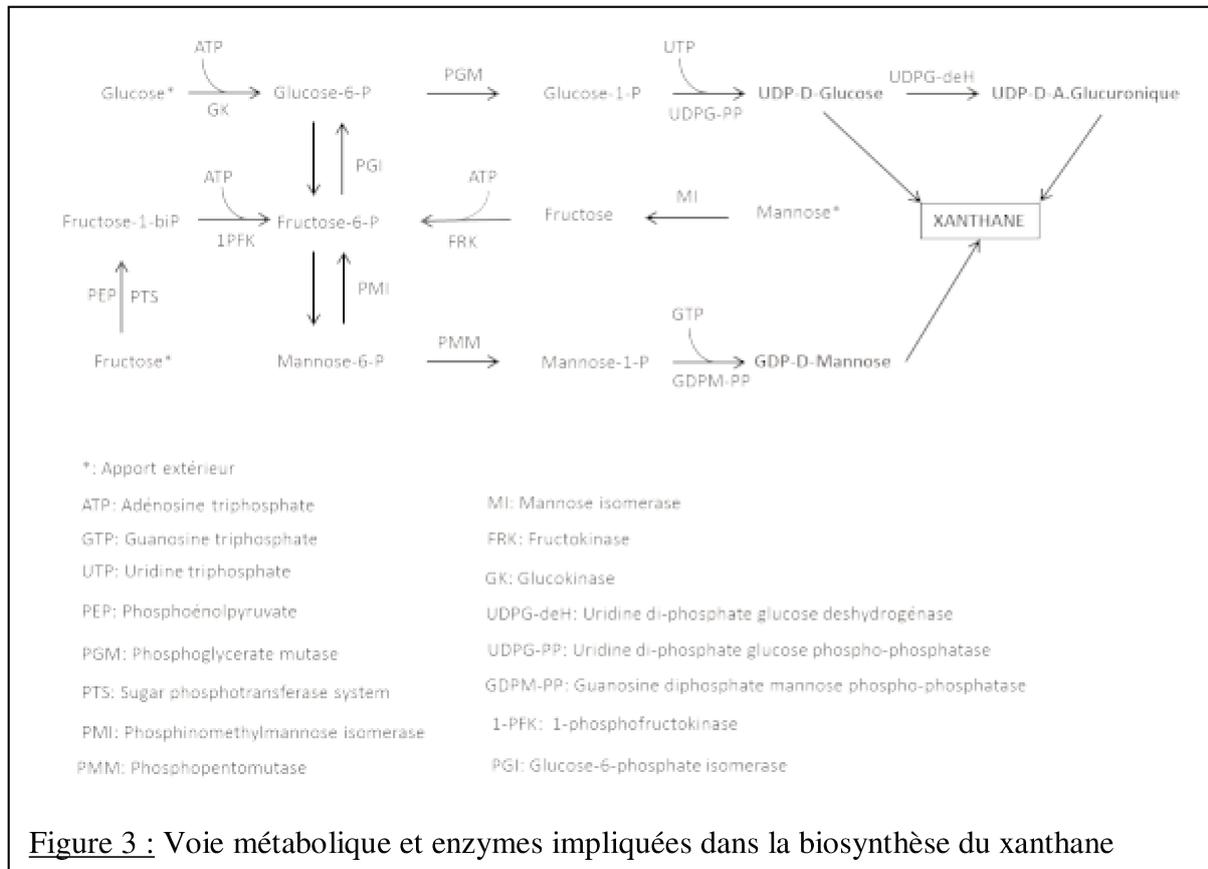
D. Voies de biosynthèse

La faculté à produire des polysaccharides est présente chez de nombreux micro-organismes et plus particulièrement chez les organismes procaryotes. Toutes les voies de biosynthèse des EPS ne sont pas encore connues car elles sont différentes et particulières à chaque bactérie. La biosynthèse de quelques EPS a toutefois été plus particulièrement étudiée du fait de l'intérêt biotechnologique de certains d'entre eux, comme les dextranses ou les xanthanes.

D'une manière générale, la production des EPS bactériens est réalisée selon des processus intracellulaires nécessitant la présence du substrat, le plus souvent un sucre simple comme le glucose ou le sucrose, dans la cellule. Ce substrat est alors phosphorylé puis éventuellement modifié selon les besoins des processus métaboliques de formation du polymère. Puis ces résidus sont transformés en nucléotides glycosilés (uridine-5'-diphosphoglucose ou UDP-glucose par exemple) qui sont les précurseurs activés du polymère. Le nombre d'enzymes est d'autant plus élevé que la composition en monomères entrant dans la composition de l'EPS est élevée. Les études menées sur *Xanthomonas campestris* pour étudier la formation du xanthane ont permis de décrire la manière dont cette espèce est capable de former les trois types d'oses (le glucose, le mannose et l'acide glucuronique) entrant dans la composition de l'EPS à partir de glucose, de mannose ou de fructose (Figure 3) (Harding et al. 1993; Cescutti 2009). Durant cette étape de biosynthèse, pas moins de 12 enzymes sont nécessaires à la synthèse des différents sucres entrant dans la composition du polymère.

Des glycosyltransférases assurent ensuite l'assemblage de l'unité répétitive par transfert de ces précurseurs sur un transporteur lipidique (undecaprenyl phosphate ou isoprénoïde pyrophosphate). A ce stade, différents groupements non osidiques peuvent être ajoutés à l'unité de répétition. Enfin, la polymérisation des monosaccharides activés est réalisée, et le polymère est excrété dans le milieu extracellulaire. Pour cette dernière étape il existe peu de données concernant des mécanismes spécifiques et l'hypothèse qui prévaut à l'heure actuelle est l'existence de transporteurs ATP-dépendant assurant le relais pour l'excrétion du polymère. Cette hypothèse semble se confirmer pour *X. campestris* et la sécrétion de xanthane

(Vanderslice et al. 1989), mais différents mécanismes semblent régir cette dernière étape chez d'autres espèces (Boulnois and Jann 1989).



Selon les souches, les EPS sont produits pendant la phase stationnaire de croissance et/ou, le plus souvent, **à la fin de la phase de croissance exponentielle**. En outre, quelques micro-organismes sont capables de produire simultanément plus d'un type d'EPS (Sutherland 2002; Sutherland 2005). La production d'EPS constitue une adaptation à la composition du milieu de culture, et peut donc être favorisée lorsque ce milieu est supplémenté en substrat carboné et limité en certains éléments nutritifs. Les conditions optimales de production d'EPS varient selon les espèces mais en général, la production d'EPS est favorisée par un ratio carbone/azote élevé, une température d'incubation inférieure de quelques degrés à la température optimale de croissance de la bactérie et une aération importante du milieu.

La synthèse des EPS bactériens fait donc appel à des voies de biosynthèses complexes nécessitant l'utilisation de plusieurs enzymes et la transcription de nombreux gènes. En outre, certaines études mettent en évidence des différences quant aux gènes transcrits codant pour la synthèse des enzymes régulant cette voie de biosynthèse chez des espèces appartenant à un même genre (Sengha et al. 1989; Osman et al. 1993; Schiller et al. 1993; Conti et al. 1994).

D'autre part, comme il a été évoqué précédemment, la synthèse de polysaccharides peut être étroitement liée à celle d'autres gènes, dont la pathogénicité.

E. Les applications biotechnologiques des EPS bactériens

Jusqu'en 1970, le marché des polymères hydrosolubles était dominé par les polysaccharides d'origine végétale (pectine, cellulose), algale (alginates, carraghénanes) et animale (chitine, chitosane, héparine), pour ensuite évoluer vers l'utilisation des polysaccharides bactériens.

En effet, les découvertes de ces dernières années ont montré que les polymères d'origine bactérienne pouvaient se substituer à des analogues d'origine végétale tels que :

- La cellulose (Prashant R. Chawla et al. 2009) pouvant être produite par un grand nombre de bactéries (Shoda and Sugano 2005) ; la cellulose bactérienne présentant un haut degré de pureté, de polymérisation et d'index de cristallinité.
- La production d'alginate (Sabra et al. 2001) avec un haut degré de pureté pour des applications dans le secteur pharmaceutique.
- La production d'héparinomimétiques (Collic-Jouault et al. 2004) comme alternative à l'héparine produite par les animaux.

Outre les avantages liés au procédé de fabrication évoqué précédemment (ci-dessus : Partie I/C), les EPS produits par fermentation bactérienne présentent généralement un degré de régularité de structure et un poids moléculaire élevés. L'ensemble de ces paramètres ajoutés à l'extraordinaire diversité de structures des EPS bactériens offrent de nombreuses possibilités d'applications.

Ainsi, les EPS bactériens trouvent de nombreuses applications dans des domaines variés tels que l'industrie agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique, médicale ou encore l'environnement comme détaillé ci-dessus (Partie I/B/2)). Leur capacité de piégeage des métaux est également une propriété intéressante permettant d'envisager leur utilisation dans la bioremediation des métaux, ou encore en cosmétique et médecine pour le traitement de

certaines maladies (Loaïc et al. 1997b; Loaïc et al. 1997a; Iyer et al. 2005; Moppert et al. 2009).

1) Exemples d'applications

Ce paragraphe décrit l'historique des développements biotechnologiques associés à la production d'EPS par voie bactérienne, et leur utilisation dans différents secteurs de l'industrie (Tableau 2) :

- Le xanthane : découvert en 1958, c'est le premier EPS ayant trouvé une application industrielle à partir de 1964 et commercialisé sous le nom de Kelzan® par l'entreprise Kelco®. Ce polysaccharide a été largement étudié et est utilisé pour de multiples applications commerciales en tant qu'agent de texture (épaississant, gélifiant), mais également pour ses propriétés stabilisantes et émulsifiantes en agroalimentaire (E415), ou encore pour la remontée assistée du pétrole. Cet hétéropolysaccharide est, en général, produit par des espèces du genre *Xanthomonas* et composé de glucose, d'acide glucuronique et de mannose essentiellement, portant parfois des groupements pyruvate et acétate (García-Ochoa et al. 2000).
- Les alginates : en 1964, près de 80 ans après la découverte des alginates chez certaines laminaires, des espèces bactériennes capables de produire des alginates ont été identifiées. Ces EPS sont produits par plusieurs espèces du genre *Pseudomonas* ou *Azotobacter* également et sont composés d'acide mannuronique et guluronique (comme chez les algues), présentant toutefois une spécificité liée à la présence de quelques groupements acétylés sur l'acide mannuronique (spécifique aux EPS bactériens).
- Le gellane : découvert en 1978 par l'entreprise Kelco®, il n'est utilisé dans le secteur industriel que depuis les années 90 sous l'identifiant de E418. Ce polymère présente l'avantage d'avoir une excellente résistance thermique et acide ce qui lui a permis de trouver des débouchés en tant qu'agent de texture dans l'agroalimentaire, mais aussi dans la pharmaceutique (enrobage pour les médicaments). Il s'agit également d'un hétéropolysaccharide produit par des espèces du genre *Pseudomonas* ou *Sphingomonas* et est composé de glucose, d'acide glucuronique et de rhamnose, parfois également constitué de groupements glycérate et acétate (Fialho et al. 2008).

- Le dextrane : les premières descriptions de la présence de dextrane remontent à 1861 par Louis Pasteur (chez la souche *Leuconostoc mesenteroides*), mais ce n'est qu'en 1874 que Scheibler qualifie cet EPS sous le nom de dextrane. Ce polysaccharide est produit par certaines espèces appartenant aux genres *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*. Le dextrane est un homopolysaccharide composé de résidus de glucose reliés entre eux par des liaisons $\alpha(1-6)$ sur l'axe principal avec des ramifications en $\alpha(1-4)$ ou $\alpha(1-2)$. Le poids moléculaire de la molécule varie de 40 à 5.10^5 kDa selon la souche productrice (Naessens et al. 2005). On retrouve ainsi de vastes applications du dextrane notamment en santé humaine (synthèse de plasma sanguin, enrobage de médicaments) ou en tant que matériel de séparation de type Sephadex® (pour SEparation PHARmacia DEXtran). Des modifications chimiques du dextrane ont montré des applications comme anticoagulant, immunostimulant (Piret et al. 2000), chélateur de métaux (mercaptodextran), en cosmétique et dans toute autre industrie faisant appel à ses propriétés émulsifiantes et épaississantes (Robyt 1985).
- Les hyaluronanes : ou acides hyaluroniques (HA) ont été extraits pour la première fois en 1932 par Karl Meyer à partir d'œil d'animaux (Simoni et al. 2002) pour leurs propriétés cicatrisantes. Ces HA sont généralement retrouvés plus spécifiquement chez les animaux à sang chaud (Laurent and Fraser 1992). Dans les années 90, les premières expériences de production de HA par voie bactérienne étaient réalisées (Chong et al. 2005) avec succès permettant de répondre à la demande croissante du marché pour ce type de polymère. Plusieurs espèces bactériennes capables de produire des HA ont ainsi été identifiées, notamment certaines bactéries des genres *Streptococcus*, *Bacillus* ou encore certaines *Lactococcus*. Les HA jouent un rôle important dans la physiologie animale au niveau des processus d'interaction de certains groupements protéiques, la régulation de la pression osmotique et l'expansion tissulaire lors de la cicatrisation (Yamada and Kawasaki 2005). D'un point de vue chimique les HA sont des hétéropolymères linéaires composés d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine reliés alternativement par des liaisons glycosidiques de type $\beta(1-4)$ et $\beta(1-3)$, et présentant un poids moléculaire variable selon l'organisme producteur (de 10 à 10^3 kDa). Les domaines d'application des HA ciblent essentiellement le secteur de la médecine. On retrouve également des applications dérivées en cosmétique avec des applications pour les traitements de la peau (régénération) notamment (Liu et al. 2011).

Tableau 2 : Énumération des EPS les plus couramment retrouvés dans le secteur industriel et de leurs caractéristiques.

Types d'EPS	Compositions	Espèces productrices	Applications	Propriétés
Xanthane	Glucose Mannose A. glucuronique Acétate Pyruvate	Xanthomonas spp	Alimentation Extraction assistée du pétrole Pharmacie Cosmétique Agriculture	-Haute viscosité -Stable à haute température, pH, salinité -Gélifiant
Gellane	Glucose Rhamnose A. glucuronique Acétate Pyruvate	Sphingomonas spp	Alimentation Pharmacie Biologie moléculaire (gel de migration)	-Stable à Ph élevé -Capacité gélifiante -Gels thermoréversibles
Alginate	A. glucuronique A. mannuronique Acétate	Azotobacter spp Pseudomonas spp	Alimentaire Médicale	-Hydrocolloïde -Capacité gélifiantes
Cellulose	Glucose	Agrobacterium spp Acinetobacter spp	Alimentaire Biomédicale Industrie papier	-Haute cristallinité -Insoluble dans la plupart des solvants -Modelable -Haute capacité de résistance
Dextrane	Glucose	Leuconostoc spp Streptococcus spp	Alimentaire Pharmaceutique Chromatographie	-Non ionique -Bonne stabilité

Types d'EPS	Compositions	Espèces productrices	Applications	Propriétés
Curdlane	Glucose	Agrobacterium spp	Alimentaire	-Gélifiant
		Rhizobium spp	Pharmaceutique	-Insoluble dans l'eau
		Cellulomonas spp	Captation des métaux lourds Additif	-Activité biologique
Hyaluronane	A. glucuronique	Streptococcus spp	Médecine	-Activité biologique
	N-ac-glucosamine	Pseudomonas spp	Cosmétique	-Hautement hydrophile -Réduction de la pression osmotique -Biocompatible
Succinoglycane	Glucose	Alcaligenes spp	Alimentaire	-Stable en milieu acide
	Galactose		Captation des huiles	-Visqueux en solution aqueuse
	Acétate			
	Pyruvate Succinate			
Levane	Fructose	Erwinia spp	Alimentaire	-Peu visqueux
		Bacillus spp	Médecine	-Hautement soluble dans l'eau
		Zymonas mobilis	Cosmétique Industrie	-Activité biologique -Réduction des pressions osmotiques
Galactopol	Galactose	nd.	Alimentaire	-Visqueux en solution aqueuse -Capacité émulsifiante
	Mannose		Cosmétique	
	Glucose		Pharmaceutique	
	Rhamnose		Médecine	
	Acétate			
	Succinate Pyruvate			
Fucopol	Fucose	Enterobacter spp	Alimentaire	-Capacité émulsifiante -Activité biologique -Visqueux en solution aqueuse
	Galactose		Cosmétique	
	Glucose		Pharmaceutique	
	Acétate		Médecine	
	Succinate Pyruvate			
Acide Colanique	Fucose	Shigella spp	Alimentaire	-Gélifiant
	Glucose	Salmonella spp		-Viscosant
	A. glucuronique	Enterobacter spp		
	Galactose	Escherichia coli		

Types d'EPS	Compositions	Espèces productrices	Applications	Propriétés
Emulsane		Acinetobacter spp	Alimentaire	-Gélifiant
			Médecine	-Hypoallergénique
			Agriculture	-Emulsifiant
Xylinane	Rhamnose	Agrobacterium spp	Alimentaire	-Viscosant
	Glucose			-Gélifiant
	Mannose			
Welane	Glucose	Alcaligenes spp	Alimentaire Industrie chimique	-Stabilisant
	A. glucuronique			-Viscosant
	Rhamnose			-Additif
Kefirane	Glucose	Lactobacillus spp	Alimentaire Pharmaceutique	-Viscosant
	Galactose			-Stabilisant -Antibactérien

De manière générale, on remarque que les premières applications des EPS bactériens à visée industrielle remontent au milieu du XX^{ème} siècle, mais que les découvertes sont bien souvent antérieures. L'évolution des prouesses technologiques et du savoir-faire scientifique a permis l'émergence d'un nouveau type d'outil de production par fermentation bactérienne permettant de répondre aux demandes et critères de qualité des industriels à l'égard des polymères.

2) Les milieux atypiques comme sources de nouveaux types d'EPS

Les polysaccharides bactériens ont déjà prouvé qu'ils pouvaient s'imposer sur le marché des polymères. Les investigations menées au cours des dernières années tendent à montrer, au regard de la diversité de structure des nouveaux polysaccharides, que leur avenir est d'autant plus prometteur.

Dans la course à l'innovation et la recherche de nouvelles structures originales, la communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux micro-organismes issus du milieu marin, riche d'une incroyable biodiversité dont seule une infime partie a été découverte à ce jour. Plus particulièrement, ces recherches portent sur les micro-organismes vivant dans des environnements hostiles ou atypiques (abysses, lacs salés, sources hydrothermales...), considérant que ces micro-organismes ont dû développer des stratégies d'adaptation pour survivre aux conditions environnementales extrêmes, via notamment la synthèse de nouvelles molécules originales.

La prospection des milieux extrêmes fut ainsi le premier pas vers la découverte de nouveaux types d'EPS. Les études menées sur les micro-organismes issus des **sources hydrothermales profondes** ont particulièrement attiré l'attention avec la mise en évidence d'une production de polysaccharides présentant des structures originales encore jamais décrites (Dubreucq et al. 1996). Plusieurs nouvelles souches bactériennes ont ainsi été découvertes durant ces recherches :

- *Vibrio diabolicus* : cette souche issue des profondeurs hydrothermales a été décrite comme étant une nouvelle espèce (Raguenes et al. 1997a) capable de produire un EPS linéaire de haut poids moléculaire (800 kDa) composé de trois types de sucres : N-acétyl-glucosamine, acide glucuronique et N-acétyl-galactosamine (Rougeaux et al. 1999b). Les applications déterminées touchent le secteur médical et cosmétique en particulier pour ses propriétés régénératrices (cicatrisation osseuse, antiride) (Colliec-Jouault et al. 2004). Ces propriétés sont probablement dues au fait que ce type d'exopolysaccharide présente de fortes analogies structurales avec l'acide hyaluronique (Deming 1998) qui est l'un des principaux composant de la matrice extracellulaire.
- *Alteromonas infernus* : il s'agit d'une souche prélevée dans le Golf de Californie à 2000 mètres de profondeur au niveau d'une source hydrothermale (Raguenes et al. 1997b). L'exopolysaccharide produit par cette souche est majoritairement composé de glucose, galactose, d'acide glucuronique et galacturonique, et dont le dérivé sulfaté présente des propriétés anticoagulantes (Colliec Jouault et al. 2001). De par ses propriétés héparinomimétiques qui semblent diminuer le risque de potentielles hémorragies

(Collic-Jouault et al. 2004), le composé néoformé trouve une application dans le milieu médical.

- *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* : cette souche est originaire du Pacifique et a été prélevée au nord du bassin de Fiji à plus de 2000 mètres de profondeur à proximité d'un site hydrothermal (Raguènes et al. 1996). L'exopolysaccharide produit par cette souche est composé de plusieurs types d'oses, glucose, galactose, mannose, acide glucuronique et acide galacturonique (Rougeaux et al. 1998), et présente des propriétés rhéologiques proches de celle du xanthane (Raguènes et al. 1996). Les propriétés rhéologiques de ce polymère semblent indiquer de potentielles applications en tant que stabilisant ou gélifiant. La composition chimique complétée par des études sur les propriétés de chélation de cet EPS semble indiquer un avenir prometteur dans le cadre du traitement des eaux usées ou dans la biodétoxification des métaux lourds (Guezennec 2002).

Outre les souches issues des profondeurs hydrothermales, d'autres environnements extrêmes tels que les **zones marines glaciales** ont été prospectés, abritant des espèces bactériennes capables de produire des EPS aux des propriétés cryoprotectrices :

- *Pseudoalteromonas arctica* : cette souche a été isolée dans la péninsule de Barton sur King George Island en milieu intertidal (archipel du Shetland, zone antarctique). Une étude préliminaire de l'EPS produit par cette souche a montré une composition osidique essentiellement constituée de glucose et de galactose. Par la suite, des tests menés sur le pouvoir cryoprotecteur de ce polymère sur *Escherichia coli* ont montré que l'efficacité constatée de ce dernier était deux fois supérieure à celle d'un cryoprotecteur commercial (ici le glycérol) avec un taux de survie des souches atteignant 90% contre 48% avec l'échantillon commercial (Kim and Yim 2007)

Les espèces des genres *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Polaribacter*, et *Olleya marilimosa* des milieux Antarctiques : une étude menée sur une collection de bactéries issues des milieux glaciaux a également mis en évidence la présence d'EPS présentant une composition osidique peu commune avec une forte présence d'acides uroniques et de groupements sulfatés indiquant une potentielle application dans la captation des métaux (Mancuso Nichols et al. 2004; Nichols et al. 2005b).

Les milieux extrêmes sont donc de formidables gisements pour la découverte de nouvelles structures exopolysaccharidiques dont certains ont aboutit au stade de l'exploitation

industrielle (Abyssine®, Hyalurift®, Glycolagen™, Lanacityn®, Hyanify™, Hyadisine™ etc...). **Les milieux tropicaux et subtropicaux** sont également des zones prometteuses en terme de découverte d'espèces bactériennes à fort potentiel de production d'EPS avec des structures chimiques originales ouvrant la voie vers des perspectives de valorisations très diversifiées (Ortega-Morales et al. 2007; Guezennec et al. 2011). D'ores et déjà certains de ces EPS ont trouvé des applications dans la fabrication de produits cosmétiques et font l'objet d'une commercialisation (Exo-P™, Exo-T™, Exo-H™).

III. Les PolyHydroxyAlcanoates (PHA)

A. Le plastique dans notre société

Plus de 300 millions de tonnes de pétrole sont consommées chaque année pour la production des matières plastiques synthétiques. Ces plastiques d'origine pétrochimique sont essentiellement le polyéthylène (PE), le polypropylène (PP), le polystyrène (PS), le polyvinyle chloride (PVC) et le polytétrafluoroéthylène (PTFE). Ces plastiques synthétiques sont très récalcitrants à la dégradation sous l'effet de facteurs biotiques (micro et macro organismes) ou abiotiques (UV, température, salinité, pH) et seule une faible proportion d'entre eux est recyclée. Ainsi, chaque année, plusieurs millions de tonnes de matières plastiques sont disséminées dans l'environnement où elles persisteront quelques centaines d'années, à l'origine de pollutions visuelles et écologiques.

Le constat réalisé par l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise des Énergies (ADEME : <http://www2.ademe.fr>) a révélé que la majorité des matières plastiques générant des pollutions par leur rejet dans l'environnement, est issue des emballages de supermarchés. Depuis 2002, la taxation des plastiques dans la grande distribution a d'ores et déjà permis de passer d'une consommation estimée à 10 milliards d'emballages à 1 milliard en 2011.

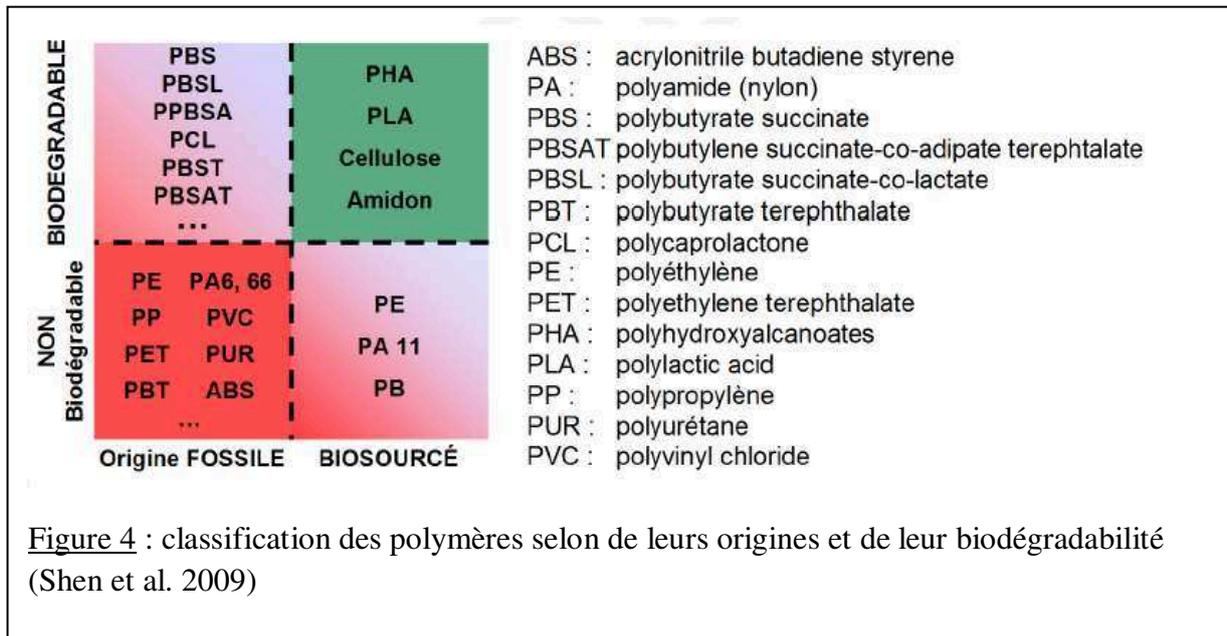
Considérant la problématique environnementale et la diminution des ressources fossiles, des solutions alternatives aux matériaux d'origine pétrochimique ont été développées parmi lesquelles la synthèse de « bioplastiques ».

Avant de poursuivre, il est important de définir le terme **Bioplastique** car son sens peut varier selon les usages (Conseil National de l'Emballage en 2009). Ce terme est utilisé aussi bien pour désigner :

- L'origine de la ressource utilisée qui est renouvelable, le terme de biosourcé est alors généralement employé.

- La gestion de la fin de vie du produit, soit sa biodégradabilité, c'est-à-dire « sa capacité intrinsèque à être dégradé par des micro-organismes naturellement présents dans l'environnement, pour simplifier sa structure et finalement se convertir en eau, CO₂ et/ou CH₄ et une nouvelle biomasse » (Source : ADEME 2005).

Ainsi les bioplastiques peuvent être des polymères biosourcés, mais non biodégradables comme le « PE vert » synthétisé à partir de bioéthanol, ou des polymères biodégradables mais d'origine fossile (Figure 4). A contrario, les PHA présentent l'avantage de combiner deux caractéristiques : être biosourcés et biodégradables.



A l'heure actuelle, le marché des bioplastiques biosourcés est encore faible : en 2009, la production massive annuelle mondiale ne représentait que 0,1 % de la production totale de matières plastiques (European Bioplastics et University of Applied Sciences and Arts Hanover 2011 et PlasticsEurope EUPC EPRO EuPR 2010). Ce marché est cependant en plein essor : selon différentes estimations, il devrait représenter entre 1 500 000 et 4 500 000 tonnes en 2020 alors qu'en 2010, il était évalué à 580 000 tonnes dont 15 % de PHA (European Bioplastics et University of Applied Sciences and Arts Hanover 2011). Ceci représenterait un taux de croissance annuel de 10 à 23%.

Les PHA, comparés aux autres bioplastiques biosourcés et biodégradables, présentent une importante gamme de propriétés thermoplastiques comparables à celles des plastiques

d'origine synthétique communément utilisés, et la perspective de les produire par fermentation bactérienne constitue un enjeu majeur pour nos sociétés modernes.

B. Description générale des PHA

La découverte en 1926 des poly(3-hydroxyalcanoates) ou PHA par le scientifique français Lemoigne qui mit en évidence la présence de produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide β -oxybutyrique (Lemoigne 1926) chez *Bacillus megaterium*. Ces produits seront par la suite appelés des poly(3-hydroxybutyrates) ou PHB et les recherches réalisées par la suite ont montré qu'un grand nombre de bactéries étaient capables de synthétiser ce type de molécule. Les travaux sur les PHA sont relancés dans les années 70 suite à la crise pétrolière. Plus tard, en 1974 de nouveaux types de PHA sont découverts, présentant quelques différences dans la structure chimique, on parlera de copolymères. Wallen et Rohwedder découvrirent ainsi des copolymères composés d'unités 3-hydroxyvalérate (3HV) et 3-hydroxyhexanoate (3HHx) (Wallen and Rohwedder 1974). En 1983, DeSmet et son équipe mettent en évidence l'espèce *Pseudomonas oleovorans*, première bactérie identifiée capable de produire naturellement un polyhydroxy-octanoate (PHO) (de Smet et al. 1983). Par la suite, des études ont permis d'isoler d'autres types de polyhydroxyalcanoates, et près de 92 monomères décrits comme **naturellement présents** (Steinbüchel and Valentin 1995).

1) Structure chimique

Les PHA sont des homo- ou hétéropolyesters linéaires formés de R-hydroxyacides, le plus souvent des 3-hydroxyacides, liés par liaison ester ([Figure 5](#)). A ce jour, près plus de cent monomères différents, d'origine **naturelle ou artificielle**, ont été identifiées chez les PHA mais seulement une partie d'entre eux sont couramment retrouvés en grande quantité ([Tableau 3](#)). Quelques cas d'hydroxylation en position 2, 4, 5 et 6, et de substitution par des

groupements méthyles, carboxyles, aromatiques, halogénés etc... sont également décrits (Steinbüchel and Valentin 1995; Zinn et al. 2001). La longueur de la chaîne carbonée des unités monomériques composant le PHA dépend principalement de la souche bactérienne et

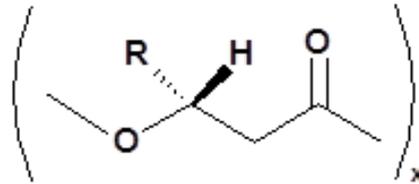


Figure 5 : Formule générale d'un poly- β -hydroxyalcanoate

de la source de carbone. Dans la chaîne principale, la présence d'un carbone asymétrique en configuration R- est liée à la stéréospécificité des enzymes de polymérisation (PHA synthases).

Tableau 3 : Sélection de monomères entrant dans la composition des PHA (Zinn et al. 2001).

Acides 3-hydroxyliques-	Acides 3-hydroxyliques- (insaturés)	Acides 3-hydroxyliques- (branchés)	Acides 3-hydroxyliques- (substitués)	Autres acides 3-hydroxyliques-
propionique	2-buténoïque	2-méthylbutyrique	cylcohexylbutyrique	4-hydroxybutyric
butyrique	4-pentanoïque	2-méthylvalérique	5-phénylvalérique	4-hydroxyvalérique
valérique	4-hexénoïque	2,6-diméthyl-5-hepténoïque	7-fluorohepténoïque	4-hydroxyhexanoïque
hexanoïque	5-hexénoïque	4-méthylhexanoïque	9-fluorononanoïque	4-hydroxyoctanoïque
heptanoïque	6-hepténoïque	5-méthylhexanoïque	6-chlorohexanoïque	5-hydroxyheptanoïque
octanoïque	6-octénoïque	4-méthyl-octanoïque	8-chlorooctanoïque	4-hydroxyhexanoïque
nonanoïque	7-octénoïque	5-méthyl-octanoïque	6-bromohexanoïque	malique
décanoïque	8-nonénoïque	6-méthyl-octanoïque	8-bromooctanoïque	
undécanoïque	9-décénoïque	6-méthylnonanoïque	11-bromoundécanoïque	
dodécanoïque	10-undécénoïque	7-méthylnonanoïque	7-cyanoheptanoïque	
tétradécanoïque	6-dodécénoïque	8-méthylnonanoïque	9-cyanononanoïque	
	5-tétradécénoïque	7-méthyl-décanoïque	12-hydroxydodécanoïque	
	5,8-tétradécadiénoïque	9-méthyl-décanoïque	succinate de méthylester	
	5,8,11-tétradécatriénoïque		acide adipique méthylester	
	4-hexadécénoïque		subérate méthylester	
	4,7-hexadécadiénoïque		subérate éthylester	
			pimélate propylester	
			acide sébacique benzylester	

Selon la longueur de la chaîne carbonée, les PHA peuvent être classés en 3 catégories :

- Les PHA à courtes chaînes ou **PHA scl** (short chain length) constitués de monomères comptant de 3 à 5 carbones. Le plus répandu des PHA scl est le poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) qui présente une cristallinité élevée et une température de fusion proche de 180°C, comparable avec certains polymères issus de la pétrochimie telles que le polypropylène (PP) (Byrom 1987). Cependant le PHB est opaque, rigide et relativement cassant ce qui limite son application industrielle. Afin de pallier à ces inconvénients, l'introduction de monomères tels que le 3-hydroxyvalérate (3HV) ou le 3-hydroxyhexanoate (3HHx) permet d'accroître considérablement les propriétés mécaniques du polymère (Bassett and Holmes 1988; Doi 1990). Un autre type de PHA scl intéressant est le poly(4-hydroxybutyrate), résistant et malléable avec des propriétés physiques proches de celles du polyéthylène. Il peut aussi être combiné à d'autres types d'acides 3-hydroxyliques afin d'en améliorer les propriétés (Kim and Lenz 2001; Rai et al. 2011).
- Les PHA à moyennes chaînes ou **PHA mcl** (medium chain length) dont les unités monomériques comptent de 6 à 14 atomes de carbone. Cet allongement des chaînes carbonées leur confère des caractéristiques physico-chimiques différentes des PHA scl. Parmi elles, on retrouve une plus grande flexibilité du matériel, un degré de cristallinité ainsi qu'une température de fusion plus faible. Avec des températures de transition vitreuses comprises entre -65 et -25°C ainsi que des températures de fusion allant de 42 à 65°C, ces polymères présentent des propriétés thermoplastiques intéressantes (Barbuzzi et al. 2004). Les parties cristallines jouent un rôle clé dans la réticulation physique permettant d'influer sur les propriétés mécaniques de ce type de PHA.
- Les PHA à longues chaînes ou **PHA lcl** (long chain length) sont constitués de monomères comptant plus de 14 atomes de carbone. Il s'agit certainement des PHA les plus inhabituels et les moins étudiés. Plusieurs raisons à cela, d'une part la consistance visqueuse de ces échantillons rend délicate leur manipulation, et d'autre part l'existence d'un nombre restreint d'applications pour ces PHA lcl dans le secteur industriel.

2) Architecture macromoléculaire

Les PHA sont accumulés sous forme d'inclusions sphériques (5 à 20 par cellules) de 0,1–0,5 μm de diamètre localisées dans le cytoplasme. Ils peuvent être visualisés à l'aide d'un microscope à contraste de phase du fait de leur haute réfractivité (Dawes and Senior 1973; Grage et al. 2009). Toutefois les PHA mcl étant moins cristallins que les PHA scl, leurs granules sont beaucoup moins visibles. Les chaînes de polymères sont organisées en microfibrilles de 10-15 nm de diamètre qui s'enroulent pour former une granule sphérique (Ballard et al. 1987). Les granules, sous leur forme native (dans la cellule), ont un cœur hydrophobe amorphe mobile (Barnard and Sanders 1989) et sont entourées d'une couche unique de phospholipides contenant des protéines structurantes appelées phasines (Sudesh et al. 2000; Steinbüchel 2001; Zinn et al. 2001), des PHA synthases (PHA polymérases), des PHA dépolymérases (Luengo et al. 2003) et des protéines régulatrices (PhaR) (Grage et al. 2009) (Figure 6).

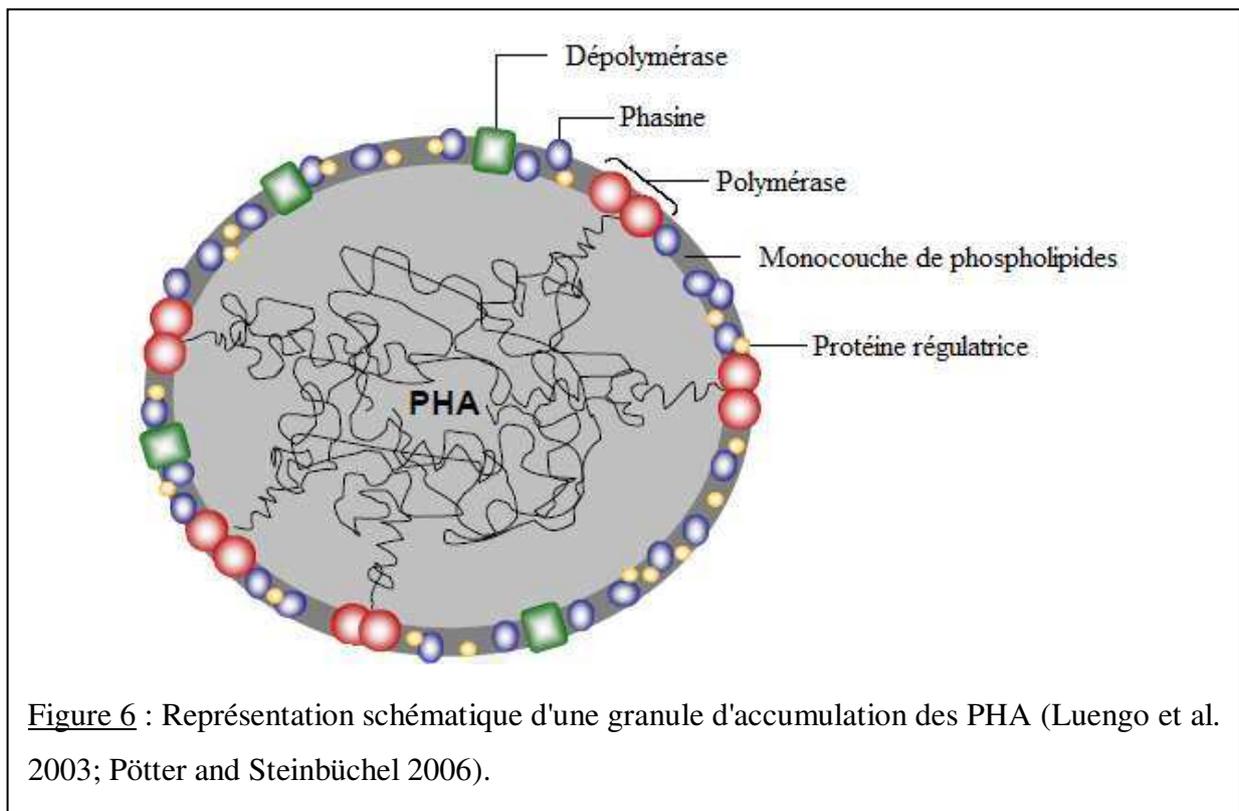


Figure 6 : Représentation schématique d'une granule d'accumulation des PHA (Luengo et al. 2003; Pötter and Steinbüchel 2006).

Le poids moléculaire des PHA se situe entre 50 et 1000 kDa selon le type de PHA, l'organisme producteur et la source de carbone (Madison and Huisman 1999), mais peut atteindre 3000 kDa chez *Cupriavidus necator* (Ballard et al. 1987; Lee et al. 2008).

Les PHA sont des polymères de réserve synthétisés par certaines bactéries en réponse à un stress énergétique, notamment un excès de source carbonée et une déplétion en certains éléments (azote, phosphore, oxygène) nécessaires à la croissance bactérienne (Anderson and Dawes 1990; Doi 1990). Ils sont accumulés au sein de la bactérie sous la forme de granules cytoplasmiques, et constituent une source de carbone disponible. L'accumulation de granules intracellulaires constitue une réserve carbonée idéale du fait de la faible solubilité de ces PHA et de leur haut poids moléculaire, de plus ils n'exercent qu'une très faible pression osmotique sur les parois cellulaires. La bactérie peut ensuite réutiliser cette réserve de carbone pour son métabolisme grâce à l'action de PHA dépolymérase intracellulaires capables de dépolymériser les PHA intracellulaires.

Certaines études ont également montré que la synthèse des PHA facilite la mise en place d'autres mécanismes propres à certains types de bactéries, tels que les mécanismes de survie par sporulation qui est également déclenchée durant des périodes de stress (exemple de genre : *Bacillus*, *Azotobacter*) (Slepecky and Law 1961; Reusch and Sadoff 1981). Chez certaines bactéries fixatrices d'azote et symbiotes des légumineuses tels que : *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, la synthèse de PHB est associée au maintien de l'activité enzymatique de la nitrogénase, efficace uniquement en anaérobiose (Senior and Dawes 1973; Anderson and Dawes 1990).

3) Récupération des PHA

L'extraction des PHA est généralement réalisée en plusieurs étapes dont la première consiste en un prétraitement des cellules (choc thermique, alcalin ou osmotique) permettant de fragiliser les parois cellulaires et ainsi faciliter l'extraction du polymère.

L'extraction proprement dite utilise généralement des **solvants chlorés** tels que le chloroforme ou le dichlorométhane qui permettent de perméabiliser la membrane et de

solubiliser les PHA. Par cette technique, les lipides sont co-extraits; pour les éliminer, le polymère est purifié par précipitations successives dans un solvant adéquat (méthanol ou éthanol). Les PHA sont solubles dans les solvants chlorés et plus la taille des chaînes latérales augmente, plus la solubilité des PHA augmente dans d'autres solvants comme le tétrahydrofurane ou l'acétone (Jacquel et al. 2007). Les méthodes d'extraction aux solvants permettent d'éliminer les endotoxines, d'obtenir un haut degré de purification et n'induisent que peu de dégradation du polymère. En revanche, ces procédés sont longs, coûteux, et présentent des risques pour l'environnement et la santé (Jacquel et al. 2008; Kunasundari and Sudesh 2011).

D'autres méthodes utilisant une **digestion chimique ou enzymatique** peuvent être également employées. Elles permettent de digérer le matériel cellulaire entourant les granules de PHA par l'intervention soit de produits chimiques, soit d'enzymes, voire la combinaison de ces différents traitements. La digestion par l'hypochlorite de sodium permet d'obtenir une bonne pureté mais peut provoquer une forte diminution du poids moléculaire. L'emploi d'une solution aqueuse à 30% d'hypochlorite de sodium pendant 30 à 60 minutes permet la destruction de la membrane bactérienne et la récupération des granules de polyester (Doi 1990; Taniguchi et al. 2003), à condition de ne pas excéder 60 minutes de traitement afin d'éviter la dégradation des chaînes du polyester. En combinaison avec du chloroforme, la dégradation du polymère peut être atténuée tout en conservant une pureté élevée. Les procédés de digestion enzymatique (Jacquel et al. 2008; Kunasundari and Sudesh 2011) utilisent des enzymes de type protéases, nucléases, des lysozymes (Byrom 1987; Jacquel et al. 2007; Kathiraser et al. 2007), des cocktails de bromélaïne et de pancréatine (Kapritchkoff et al. 2006) ou encore des extraits lytiques issus de cultures microbiennes (Lakshman and Shamala 2006). Ces méthodes permettent d'obtenir une bonne récupération mais les procédés restent complexes et coûteux. Des traitements supplémentaires peuvent être envisagés pour améliorer la qualité du produit final comme l'utilisation de peroxyde d'hydrogène (Holmes and Lim 1990) ou d'ozone (Jacquel et al. 2008).

De nouvelles méthodes émergent telles que l'extraction en fluide supercritique (Hampson and Ashby 1999; Hejazi et al. 2003), l'irradiation aux rayons gamma (Divyashree et al. 2009), l'autolyse (Martínez et al. 2011), ou encore les liquides ioniques (Wilkes and Zaworotko 1992).

C. Voies de biosynthèse chez les bactéries.

De par sa découverte au début du XX^{ème} siècle et son abondance au sein des communautés bactériennes, le PHB est le PHA le plus étudié et dont pour lequel les voies métaboliques sont les mieux connues. À l'heure actuelle huit voies métaboliques différentes aboutissant à la synthèse de PHA ont été identifiées sur différents modèles bactériens : (1) *Alcaligenes eutrophus* (actuellement renommé : *Ralstonia eutropha*) (Steinbüchel and Schlegel 1991), (2) *Pseudomonas cichorii* (Honma et al. 2004), (3) *Bacillus megaterium* (Poirier et al. 1995), (4) *Cupriavidus necator* (Doi 1995), (5) *Clostridium kluveri* et *Escherichia coli* recombinant (Valentin and Dennis 1997), (6) un mutant recombinant *Alcaligenes eutrophus* (Valentin and Steinbüchel 1995), (7) *Aeromonas hydrophila* (Qiu et al. 2006) et (8) *Brevibacterium epidermidis* (Brzostowicz et al. 2002) (Figure 7).

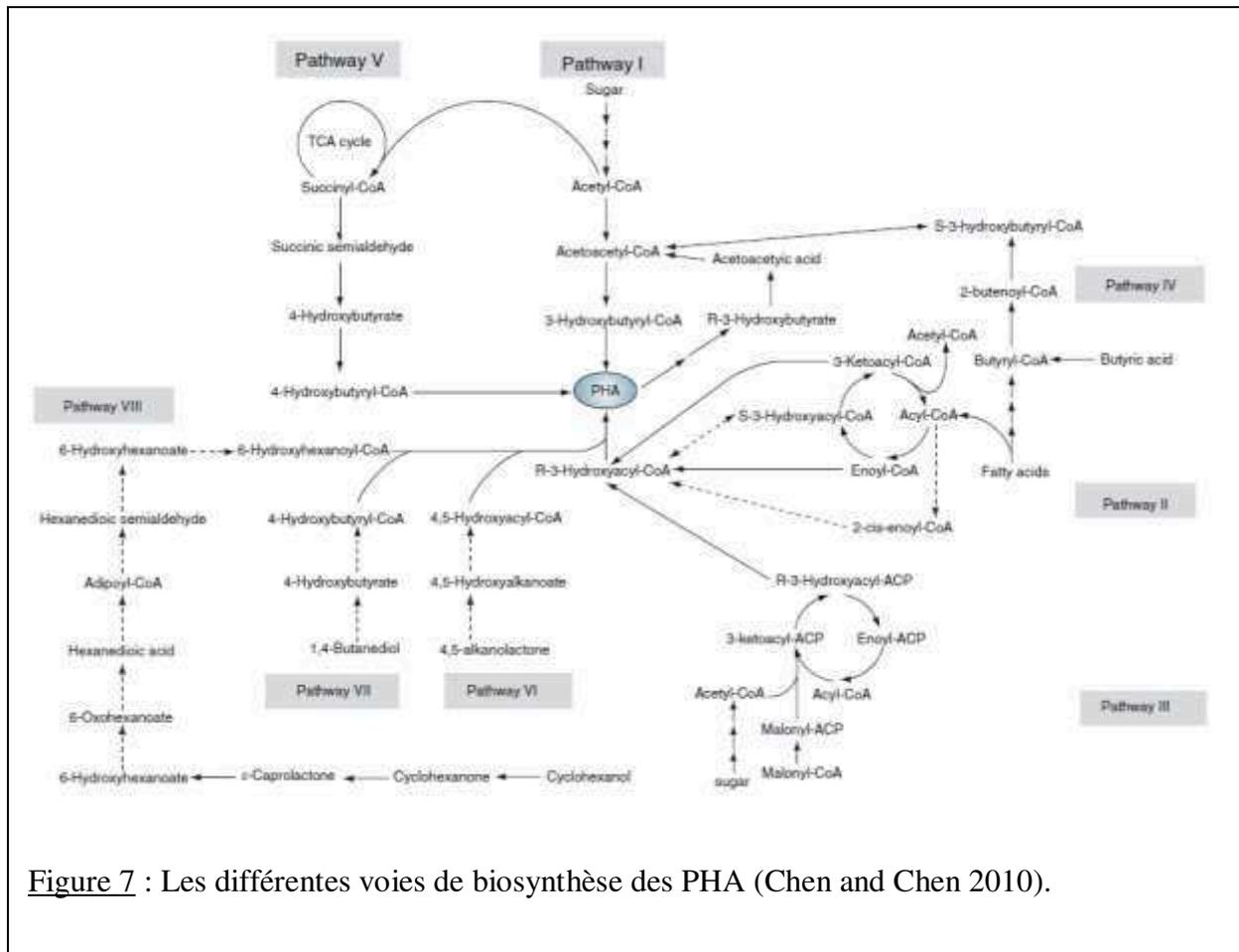
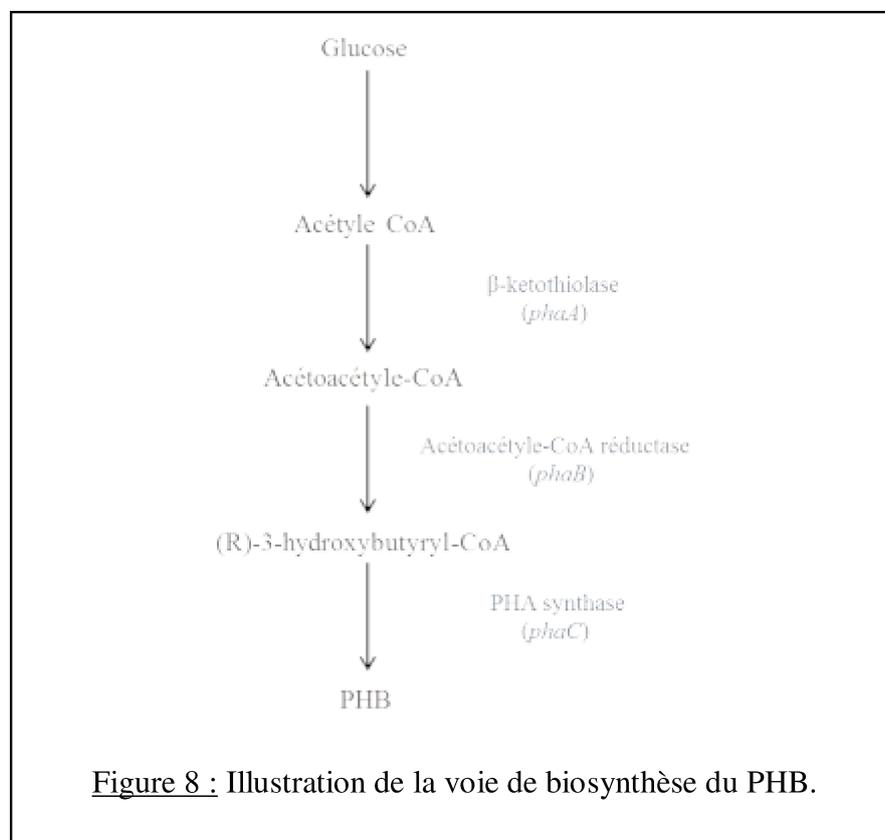


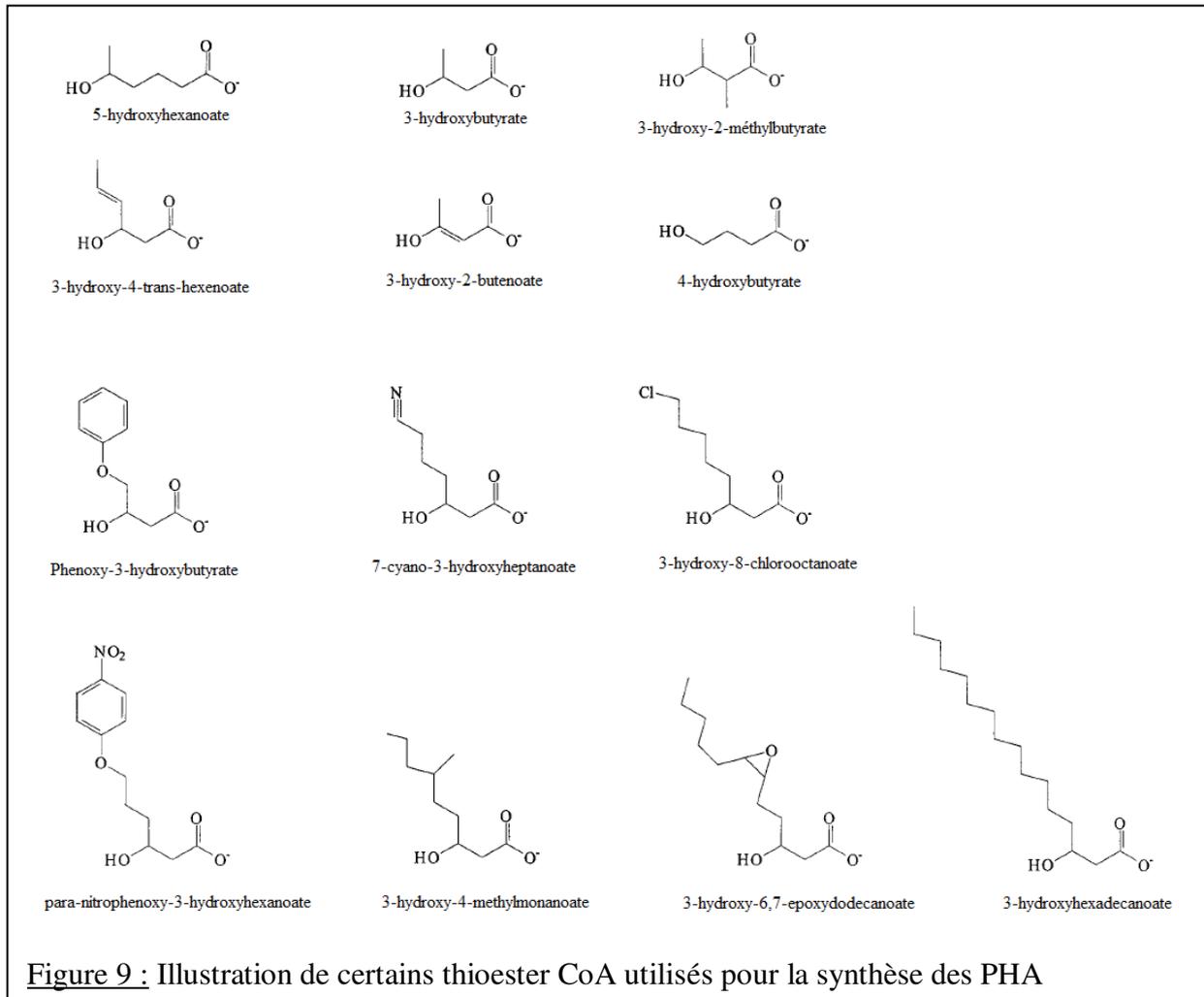
Figure 7 : Les différentes voies de biosynthèse des PHA (Chen and Chen 2010).

Le modèle d'étude le plus couramment retrouvé est celui décrit par *R. eutropha* capable de synthétiser du PHB à partir de l'acétylcoenzyme A (acétyl-CoA) en utilisant trois enzymes clé :

- La première est la β -ketothiolase codée par le gène *phaA* qui va condenser deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA, et ceci de manière réversible.
- La seconde enzyme est l'acétoacétyl-CoA réductase codée par le gène *phaB* et va permettre la réduction de l'acétoacétyl-CoA en (R)-3-hydroxybutyryl-CoA.
- Enfin la PHA synthase va polymériser les (R)-3-hydroxybutyryl-CoA (ou plus généralement appelés thioester-CoA) sous forme de PHA. (Figure 8).



Ce modèle descriptif est retrouvé pour la synthèse du PHB à partir du glucose, mais la synthèse de PHA au sens large du terme englobe des processus bien plus larges et passe dans chacun des cas par une enzyme clé, la PHA synthase. Cette enzyme permet la polymérisation des PHA et la synthèse de plusieurs types de polymères (courtes et longues chaînes). Il existe quatre grandes classes de PHA synthases capables d'utiliser différents types de thioester CoA comme substrat (Figure 9) :



- La classe I est retrouvée chez des espèces telles que *R. eutropha*, l'enzyme est constituée d'une seule sous-unité (masse moléculaire comprise entre 61-73 kDa) qui va polymériser préférentiellement les acides gras de type (R)-3-hydroxy (plus particulièrement le R(-)-3-hydroxybutyryl-CoA) composé de 3 à 5 atomes de carbone (Steinbüchel and Schlegel 1991; Qi and Rehm 2001).
- La classe II est typique des espèces du genre *Pseudomonas* (exemple : *P. aeruginosa*) avec un polypeptide de masse moléculaire proche de celle de la classe I, mais est capable de polymériser des acides gras formés de 6 à 14 atomes de carbone (Peoples and Sinskey 1989; Slater et al. 1992; Amara and Rehm 2003).
- La PHA synthase de classe III (ex : *A. vinosum*) est composée de deux sous-unités de masse moléculaire proches de 40 kDa respectivement. Ces deux sous-unités sont issues

de la transcription des gènes *phaC* (21-28% d'homologie séquentielle avec les gènes *phaC* de classe I et II) et *phaE*. Ce type de PHA synthase montre également une préférence pour les acides gras des thioesters CoA de faible taille (entre 3 à 5 carbones) (Rehm and Steinbüchel 1999).

- Enfin la PHA synthase de classe IV (ex : *B. megaterium*) est également formée de deux sous unités semblables à celle de la classe III, la différence se situe au niveau de la seconde sous-unité (masse moléculaire : 20 kDa) qui n'est pas transcrite par le gène *phaE*, mais par le gène *phaR* (Rehm 2003).

Ces quatre classes de PHA synthases interagissent avec plusieurs voies métaboliques pour former les différents types de PHA (Figure 10) (Luengo et al. 2003).

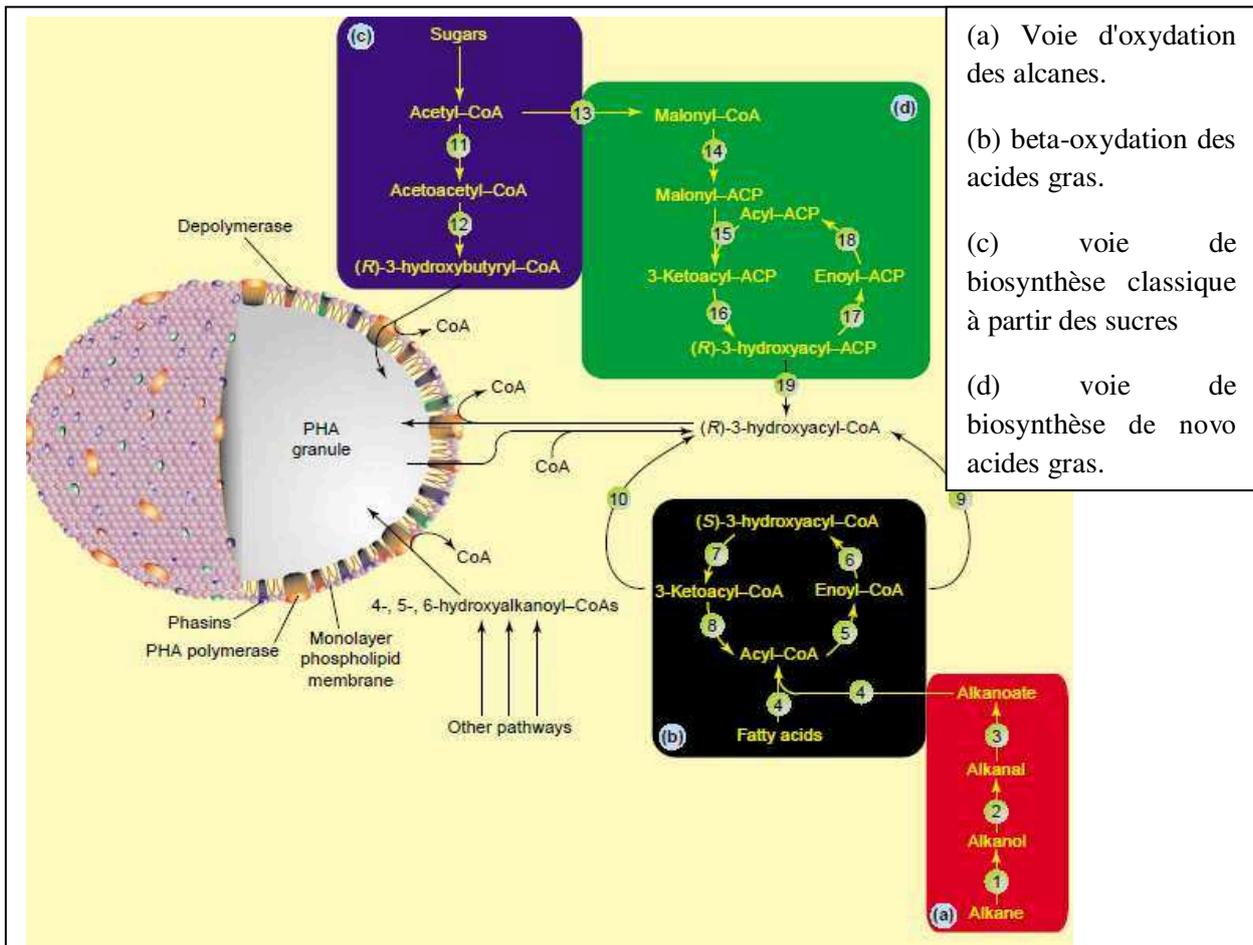


Figure 10 : Illustration des interactions possibles entre les voies métaboliques pour la synthèse de PHA. (Luengo et al. 2003)

Remarque :

On retrouve dans la littérature un grand nombre de PHA synthases différentes en effet on répertorie à l'heure actuelle plus de 59, toutes classes confondues, avec des pourcentages d'homologie de séquence allant de 8 à 96% (Rehm 2003). Il existe ainsi des espèces qui échappent aux types de classements enzymatiques cités précédemment, c'est le cas de :

- *Aeromonas punctata* produisant du PHB et qui ne possède que 45% d'homologie avec la PHA synthase de type I (Fukui and Doi 1997).
- *Pseudomonas* sp. 61-3, son enzyme est proche de la PHA synthase de classe II présentant 80% d'homologie avec cette dernière (Matsusaki et al. 2000).
- *Thiocapsa pfennigii* composé de deux sous unités, avec 85% d'homologie avec la PHA synthase de classe III (Liebergesell et al. 2000).

Le cas de l'hydroxyvalérate :

Comme ceci a été évoqué précédemment *R. eutropha* possède une PHA synthase de classe I qui montre une préférence pour les substrats de type C3-C5 engendrant la synthèse de PHA scl. Cette bactérie peut également produire des PHA d'un autre type (Doi 1990; Steinbüchel and Schlegel 1991; Dias et al. 2006). L'addition de propionate ou de valérate en complément du glucose induit la production d'un copolymère de 3-hydroxybutyrate (3HB) et 3-hydroxyvalérate (3HV) pour former un P(HB-HV) (ou PHBV). L'étude de ce phénomène a révélé la présence d'une voie métabolique parallèle avec la présence d'une nouvelle enzyme la 3-ketothiolase (gène *bktB*) (Slater et al. 1988; Poirier et al. 2002) (Figure 11).

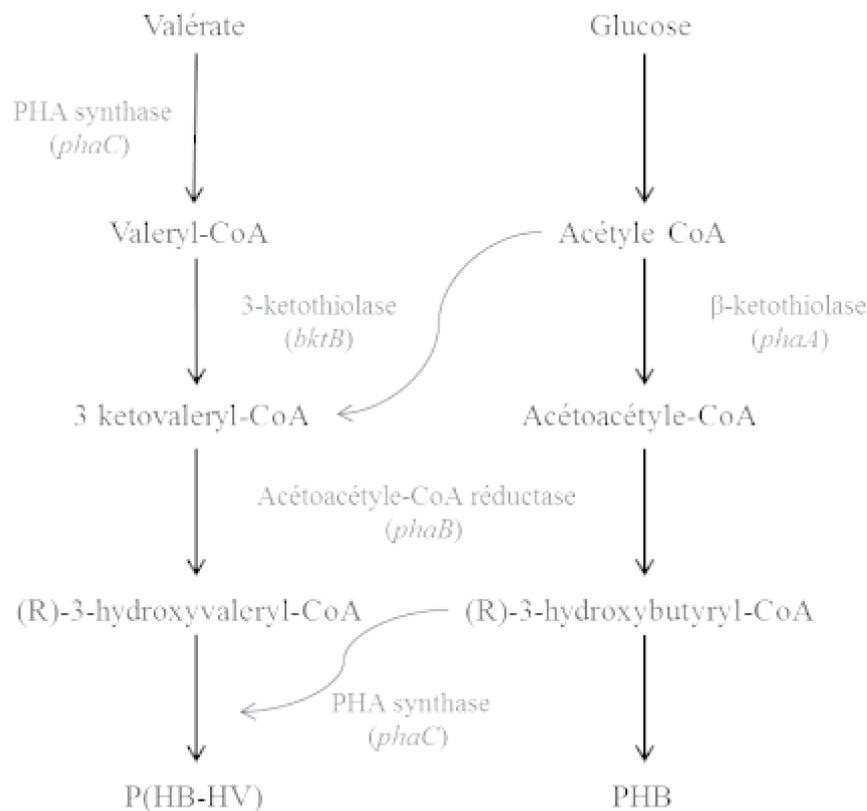
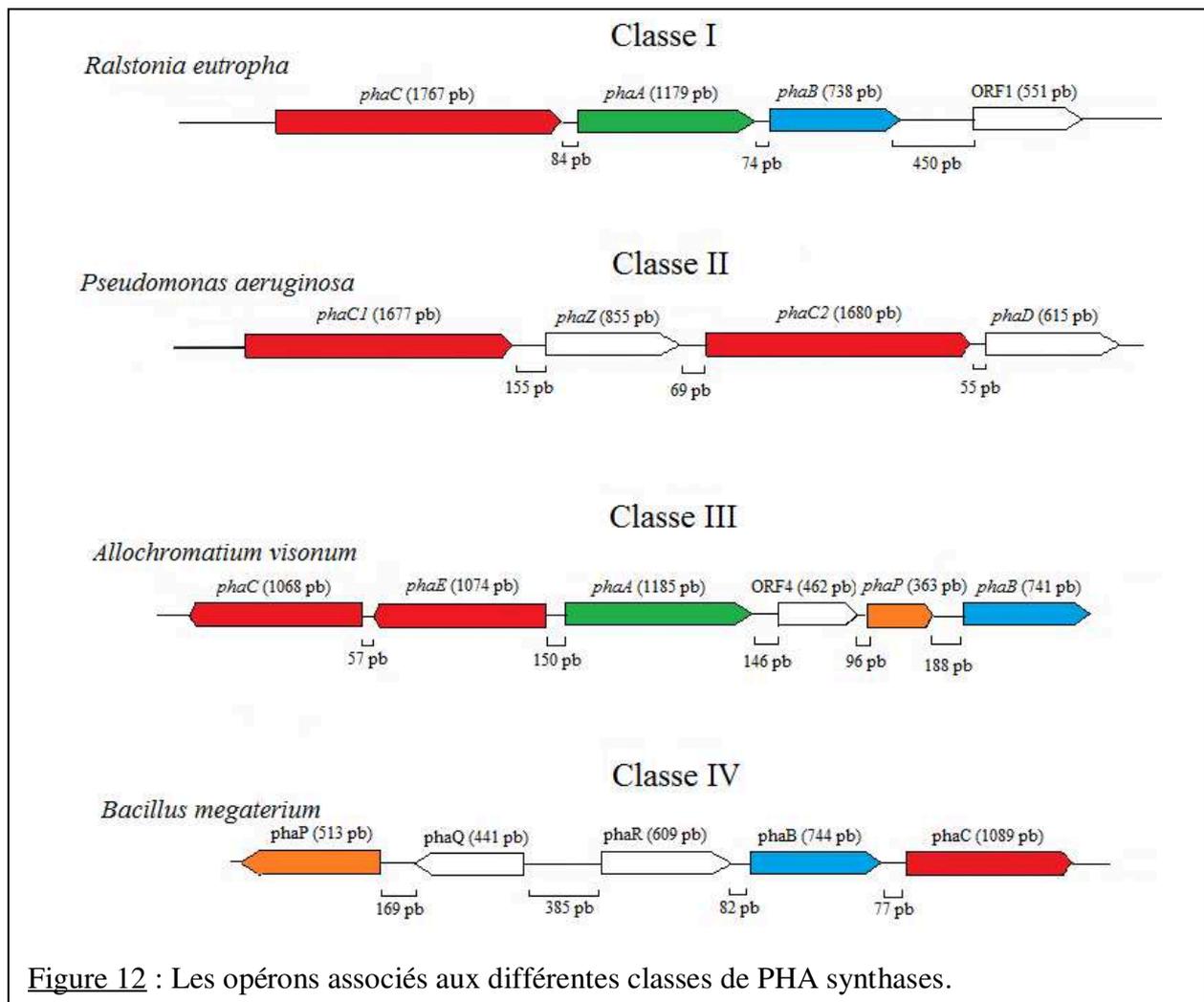


Figure 11 : Voie de biosynthèse du P(HB-HV).

D'un point de vue génétique, on retrouve souvent les gènes de la PHA synthase regroupés au sein d'un opéron avec d'autres enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des PHA (Rehm and Steinbüchel 1999; 2005). On distingue ainsi 4 types d'opérons correspondant aux 4 classes de PHA synthase évoquées précédemment. Le modèle proposé pour l'opéron de classe I a été inspiré des études entreprises sur *R. eutropha* et est valable sur un grand nombre d'espèces appartenant aux α -Proteobacteria (Valentin and Steinbüchel 1993; Tombolini et al. 1995; Cevallos et al. 1996; Mandon et al. 1998; Maehara et al. 1999; Qi and Rehm 2001). L'ensemble des *Pseudomonaceae* accumulant des PHA *mcl* a pu être intégré sur un modèle correspondant à l'opéron de classe II. De la même manière l'opéron de classes III est le modèle représentatif pour la majorité des espèces pourvue de la PHA synthase de type III. Pour les PHA synthases de classes IV, un modèle a également été proposé. On ne connaît à l'heure actuelle que quelques exceptions pour les espèces du genre *Bacillus* (McCool and Cannon 2001; Satoh et al. 2002; Suriyamongkol et al. 2007). Le modèle illustrant les différentes classes d'opérons a été inspiré des travaux de Rehm et Steinbüchel (Rehm and Steinbüchel 1999) (Figure 12).



D. Propriétés et applications des PHA

Les PHA sont des esters produits naturellement par certaines bactéries à partir de ressources renouvelables (carbohydrates, acides gras, co-produits...). Ils sont aussi biodégradables, biocompatibles, et forment une grande famille de thermoplastiques dont la diversité de structures donne accès à une large gamme de matériaux présentant des propriétés physico-chimiques variées et pouvant trouver des applications dans de nombreux domaines.

1) Propriétés chimiques

La majorité des PHA bactériens se présentent sous la forme hydroxylée sur le carbone 3. Ils possèdent un carbone asymétrique sur leur chaîne principale dont le centre de chiralité se présente exclusivement sous la configuration stéréochimique (R). Ainsi les PHA apparaissent, pour la plupart, comme des polymères isotactiques et optiquement actifs (Akita et al. 1976). Cette isotacticité qui leur confère un caractère cristallin est due à la stéréospécificité des enzymes responsables de leur biosynthèse; elle explique par ailleurs le caractère biodégradable de ces polymères, les enzymes dégradant les PHA étant elles aussi stéréospécifiques.

2) Propriétés physiques

Lors de l'extraction, les PHA, à l'état de fluide amorphe à l'intérieur des granules intracytoplasmiques, deviennent cristallins, ce qui donne un matériau plus ou moins rigide caractérisé par des propriétés thermiques et mécaniques dépendant de la composition monomérique.

Les PHA scl sont des polymères très cristallins dont les propriétés thermiques dépendent de la nature des unités monomériques entrant dans leur composition. Le P(3)HB a de bonnes propriétés thermoplastiques et possède une température de fusion de l'ordre de 179°C, proche de sa température de dégradation (200°C) ce qui est un facteur limitant pour les procédés de transformation. L'incorporation d'unités 3-HV dans du P(3)HB produit un copolymère de type P (3HB-co-3HV), moins rigide et moins cassant, avec une température de transition vitreuse (Tg) et une température de fusion (Tm) réduites tout en conservant une cristallinité équivalente.

Les PHA mcl sont des thermoplastiques élastomères présentant un faible taux de cristallinité (entre 20 et 40% en moyenne), du fait de la présence de chaînes pendantes (de taille variable) qui perturbent la cristallisation des chaînes polyesters (Sánchez et al. 2003). Ils présentent des Tg comprises entre -25 et -65°C et des Tm comprises entre 42 et 65°C (Rai et al. 2011). L'intérêt des copolymères vise à augmenter les capacités physiques des matériaux, par exemple l'incorporation de monomères de type 3-hydroxyoctanoate 3(HO) permet d'augmenter les propriétés élastiques du polymère (Marschessault et al. 1990; Preusting et al. 1990; Gagnon et al. 1992). L'incorporation au PHA du 3-hydroxyundécénoate 3(HU) permet d'obtenir des structures portant des insaturations sur les chaînes latérales ce qui permet de générer des matériaux fonctionnalisables. On retrouve couramment dans la bibliographie le cas du poly(3-hydroxyoctanoate-co-hydroxyundécénoate) (PHOU) qui est un polymère avec des doubles liaisons en parties terminales, plus sujet à des modifications ultérieures (Bear et al. 2001).

Les propriétés mécaniques et thermiques de quelques PHA scl et mcl en comparaison avec quelques polyesters d'origine pétrochimique sont présentées dans le [Tableau 4](#).

Tableau 4: Comparatif des propriétés physicochimiques des PHA

Type de polymères	Tg (°C)	Tm (°C)	Cristallinité (%)	
P(3HB)	4	180	60	(Doi 1990; Sudesh et al. 2000)
P(3HB-co-3% 3HV)	8	170	59	(Kaplan 1998)
P(3HB-co-14% 3HV)	4	150	57	(Kaplan 1998)
P(3HB-co-25% 3HV)	-1	137	54	(Kaplan 1998)
P(3HB-co-75% 3HV)	-13	83	54	(Yoshiharu 1990)
P(3HB-co-20% HHx)	-4	52	18	(Doi 1995)
P(3HB-co-7%P4HB)	-2	172	50	(Saito and Doi 1994; Saito et al. 1996)
P(3HB-co-16%P4HB)	-7	130	45	(Saito et al. 1996)
P(3HB-co-64%P4HB)	-35	50	15	(Saito et al. 1996)
P(4HB)	-48	53	34	(Saito and Doi 1994; Saito et al. 1996)
PHA mcl	-25 à -40	40 à 65	20 à 40	(Gross R.A et al. 1989)
PHO	-36	48	13	(Simon-Colin et al. 2012b)
P(HO-co-2,5%HU)	-39	54	7,5	(Simon-Colin et al. 2012b)
P(HO-co-12%HU)	-43	46	5	(Simon-Colin et al. 2012b)
P(HO-co-25%HU)	-50	nd	nd	(Simon-Colin et al. 2012b)
Polypropylène	-10	176	30	(Yoshiharu 1990)
Polystyrène	100	240	large gamme	(Young et al. 1975)

Outre ces propriétés mécaniques, les PHA sont résistants aux UV et présentent des propriétés intéressantes en tant que barrière pour certains gaz (en particulier à l'oxygène).

3) Biodégradabilité

Une des propriétés les plus attractives des PHA est liée à leur biodégradabilité assurée par de nombreux organismes naturellement présents dans l'environnement (bactéries, champignons...) qui sont capables de sécréter des PHA dépolymérase permettant de dégrader les PHA en molécules d'eau et dioxyde de carbone (aérobie) ou méthane (anaérobie)

qu'elles utilisent pour leur métabolisme. Le taux et la vitesse de biodégradation dépendent de nombreux facteurs dont la population microbienne, la température, et la nature du polymère.

a. En milieu extérieur

Afin d'étudier la biodégradabilité des PHA, la plupart des études ont pris le P(3HB) comme molécule de référence et l'ont testé sur un ensemble de micro-organismes appartenant à la famille des Pseudonocardaceae, Micromonosporaceae, Thermomonosporaceae, Streptoporangiaceae et Streptomycetaceae connus pour dégrader les P(3HB) dans leur environnement (Manna and Paul 2000; Tokiwa and Calabia 2004). Le polymère est ainsi dégradé en 3-hydroxybutyrate par les enzymes PHA dépolymérase puis est oxydé et réduit en acétyl CoA pour être utilisé dans le cycle de l'acide citrique et finalement oxydé en CO₂ (Jendrossek 2001). Il existe un grand nombre d'organismes capables de dégrader les PHA dans l'environnement, qu'ils soient bactériens ou fongiques en libérant des enzymes dans le milieu extracellulaire afin de solubiliser les polymères et les absorber (Holmes 1985).

b. La biodégradation in vivo

Parmi les applications des PHA, on retrouve une utilisation dans les implants ou les matériaux chirurgicaux. Les mécanismes de dégradation des PHA in vivo sont d'une grande importance pour de futures applications, car celle-ci doit être proportionnelle à la régénération du tissu traité (ni trop rapide, ni trop lente). Une étude menée par Duvernoy et son équipe a rapporté que dans leurs expériences, les films de P(3HB) perdaient de 30 à 80% de leur masse en une année (Duvernoy et al. 1995). Les études in vitro sont arrivées à la conclusion que la dégradation des PHA dans l'organisme est en fait multiphasique et dépendante de la température et du pH. Dans les premières semaines, le polymère perd de sa cristallinité et s'érode lentement libérant des mono-, di- et tétramères dans le milieu réducteur ainsi la masse molaire de la molécule jusqu'à sa disparition sur une période estimée entre 2 et 3 ans (Volova 2004). Ces résultats sont en corrélation avec les dernières études sur la biodégradation in vivo des PHA et encouragent la recherche pour des applications dans le milieu médical (Valappil et al. 2006).

4) Biocompatibilité

La biocompatibilité peut être définie comme la capacité d'un biomatériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique (Prime 1991). De nombreux travaux attestent du caractère biocompatible des PHA et plus particulièrement celle du PHB (Zinn et al. 2001). En effet, on considère que l'unité monomérique l'acide 3-(R)-hydroxybutyrique et que les oligomères de PHBs sont des constituants naturels du plasma humain dont les concentrations sont comprises entre 0,3 et 1,3 mM pour le monomère et 0,6 et 18,2 mg.L⁻¹ pour les oligomères (Reusch 1995; Wiggam et al. 1997)

E. Les applications biotechnologiques des PHA bactériens

1) Exemples d'applications

En raison de leur caractère biorenouvelable, biodégradable et biocompatible, les PHA sont des matériaux très intéressants pour des applications dans de nombreux secteurs industriels :

- Emballage : notamment pour la conception de nouveaux emballages biodégradables issus de ressources renouvelables comme des sacs, contenants ou encore pour l'imperméabilisation du papier. On retrouve des PHA pour la fabrication d'objets jetables tels que les rasoirs, récipients de cosmétique, bouteilles de shampoings, vaisselle jetable (gobelet, assiettes, couverts)(Lenz and Marchessault 2004). L'une des premières applications des PHA a débuté en avril 1990 par Biopol (ICI, UK) et l'élaboration de bouteilles de shampoing entièrement biodégradables (Weiner 1997). En outre, du fait de leurs propriétés barrières aux gaz, notamment à l'oxygène, les PHA présentent un intérêt pour l'imperméabilité des aliments sous atmosphère protectrice (Pedersen et al. 2001).

- Domaine médical : du fait de leurs biodégradabilité et biocompatibilité intrinsèques et de la grande diversité de structures, les PHA sont des biopolymères très prometteurs pour des applications dans le domaine médical en tant que biomatériau tels que des patches cardiaques, des valves artificielles, des implants, des sutures (Williams and Martin 2002), des excipients ou dans l'enrobage de composés à libération contrôlée (Zinn et al. 2001). A noter que l'hydrophobicité naturelle des PHA n'est pas propice à une utilisation en l'état pour les applications médicales, et que des modifications du PHA natif sont souvent réalisées afin de les rendre solubles dans les solvants polaires. Afin d'accroître l'hydrophilie et/ou d'améliorer la dégradation hydrolytique des PHA, de nouvelles fonctions (époxyde, acide carboxylique, groupement hydroxyle) peuvent être introduites notamment au niveau des doubles liaisons latérales réactives présentes sur certains PHA (Bear et al. 1997; Renard et al. 2004; Renard et al. 2005; Guérin et al. 2010). En outre, ces nouveaux groupements fonctionnels peuvent être utilisés pour greffer des molécules bioactives, ou des oligomères très intéressants pour la vectorisation et la libération contrôlée de médicaments (Babinot et al. 2010).

- Agriculture : le secteur de l'agriculture fait également appel aux propriétés des PHA notamment dans la confection de films de protection pour les cultures, confectionnés à partir de P(3HB) couplé à des PHA à moyenne chaîne pour plus de souplesse (Hocking and Marchessault 1994), et commercialisés sous le nom de Nodax™. On retrouve également la confection de billes à libération lente (engrais ou insecticide) inspirées du secteur pharmaceutique (Holmes 1985). Une dernière application développée plus récemment est l'utilisation des PHA pour l'inoculation de souches bactériennes fixatrices d'azote afin d'accroître le rendement des récoltes (Kadouri et al. 2003; Kadouri et al. 2005).

De nombreuses autres applications des PHA existent, dans l'industrie textile, en alimentation animale ou bien dans le secteur des nano-composés.

2) La valeur marchande

Lors de l'entrée des PHA sur le marché, la filière a été très rapidement limitée par sa capacité et son coût de production étant devenus des obstacles à leur affirmation en tant qu'alternative aux plastiques pétrochimiques. L'entreprise BIOPOL® a été la première à se lancer dans la production de PHA issus de *R. eutropha* avec l'apport de glucose et de propionate comme substrat carboné, aboutissant à des prix de l'ordre de 16\$ US par kilogramme (Lee 1996). L'entreprise Proter & Gamble a, au travers de ses recherches d'optimisation, réussi à développer le Nodax™ avec des prix avoisinant les 2,2\$ US par kilogramme (Keenan et al. 2005). La compagnie Metabolix (créée en 1992) est leader mondial dans le développement des matériaux issus de ressources renouvelables tels que les PHA. Cette compagnie a établi en 2006 un partenariat avec ADM (Archer Daniel Midland Company) afin de produire et d'exporter des plastiques de PHA à travers les États-Unis, l'Europe et d'autres pays d'Asie. La même année Metabolix a réussi à lever un appel d'offres émanant des États-Unis pour une somme de 95,2 millions de \$ US. Metabolix est actuellement l'entreprise leader dans le monde pour la production et l'exportation de plastiques biodégradables.

La thématique des plastiques biodégradables sera amenée à se développer dans les années à venir pour des raisons économiques (augmentation des prix du pétrole), écologiques (prise de conscience vis-à-vis de l'impact environnemental) et sanitaires (moyen de traitement des déchets carbonés). Ajouté à cela, la création en 2007 de la réglementation REACH pour l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques, rationalise l'introduction de nouvelles substances chimiques au sein de l'Union Européenne, et encourage le développement des travaux de recherche sur les biopolymères.

Partie II : Les bactéries de Nouvelle-
Calédonie : prospection, mise en collection et
phylogénie

I. Présentation de la Nouvelle-Calédonie

La Nouvelle-Calédonie est un archipel mélanésien baigné par un climat subtropical et ayant la caractéristique d'abriter le plus grand lagon du monde. La Grande Terre (subdivisée en deux avec la Province Nord et la Province Sud) qui constitue l'île principale est entourée de l'Île des Pins, des Îles Loyautés (Maré, Lifou, Ouvéa) et des Îles de Belep qui gravitent autour d'elle. Il s'agit également d'un territoire regroupant près de 1,5 million de km² de zones maritimes comprenant des milieux intertidaux extrêmement riches et variés autour desquels pullulent faune et flore d'une diversité unique au monde. Parmi ces milieux intertidaux, on retrouve platiers, récifs coralliens, falaises calcaires, plages de sable, herbiers, algueraies, mangroves, vasières et tannes sursalées, ainsi que sources hydrothermales. La diversité des habitats ainsi que l'isolement géographique du territoire (1500 km de l'Australie et 2000 km de la Nouvelle-Zélande) ont favorisé l'émergence d'espèces propres à cette région du monde et suscitent l'intérêt de nombreux organismes de recherches nationaux et internationaux.

Dans le domaine de la microbiologie, on retrouve des études décrivant plusieurs espèces nouvelles issues du sol calédonien et une utilisation potentielle notamment dans la revégétalisation des maquis miniers (Saintpierre et al. 2003; Saintpierre-Bonaccio et al. 2004; Saintpierre-Bonaccio et al. 2005). Il s'agit là des premiers cas portant sur la valorisation et l'exploitation microbienne sur le territoire.

Les études sur la thématique des bactéries marines de Nouvelle-Calédonie sont encore très restreintes et portent essentiellement sur l'écologie microbienne au sens large (Kristensen et al. 2008; Pringault et al. 2008; Torréton et al. 2010) ou encore sur l'étude des impacts, de l'identification et de la lutte contre les pathogènes en aquaculture (Costa et al. 1998; Goarant et al. 2006; Goarant et al. 2007). L'étude bibliographique menée n'a permis de trouver que très peu d'information portant sur la valorisation des micro-organismes marins (Guillemard et al. 2012), il s'agit donc là du premier projet de ce type sur le territoire.

II. Le matériel biologique

A. Prospection, échantillonnage, et mise en collection

1) Les campagnes des prospections

Les deux missions de prospections qui ont eu lieu en avril 2010 et en avril 2011 sur des zones essentiellement situées sur la côte ouest de la Grande Terre et l'Île des Pins sont à l'origine de la première collection de bactéries marines de Nouvelle-Calédonie (Figure 13). Les zones prospectées ont été sélectionnées, car elles étaient représentatives de zones « atypiques » avec un fort balancement des marées et des conditions météorologiques qui provoquent de grandes variations des facteurs abiotiques (UV, salinité, température, pH). La première mission de bio-prospection a ainsi été réalisée sur 5 zones regroupant 13 sites d'échantillonnages (tannes, mangrove, platier, récif corallien, estuaire...) situées en Province Nord, en Province Sud et sur le lagon sud (Tableau 5). Au total 165 prélèvements ont été effectués durant cette mission par prélèvements de substrats (vase, eau, biofilm), par écouvillonnage (organismes vivants, surfaces inertes) ou encore par carottage. Pour la seconde campagne, trois zones ont été prospectées : Le Sud (sol de type latérite) et plus particulièrement le site de Prony avec son activité hydrothermale marine ; la barrière de corail (partie émergée à marée basse), et l'Île des Pins (milieux de types coralliens, platiers, plages de sable et zones marécageuses). Sur ce dernier lieu, ce sont des sites à l'écart des zones touristiques ou des sites « tabou » régis par la coutume mélanésienne qui ont été prospectés afin de préserver les prélèvements d'une contamination anthropique. Sur les 6 sites prospectés, 84 prélèvements ont été obtenus, par écouvillonnage ou échantillonnage de substrats.

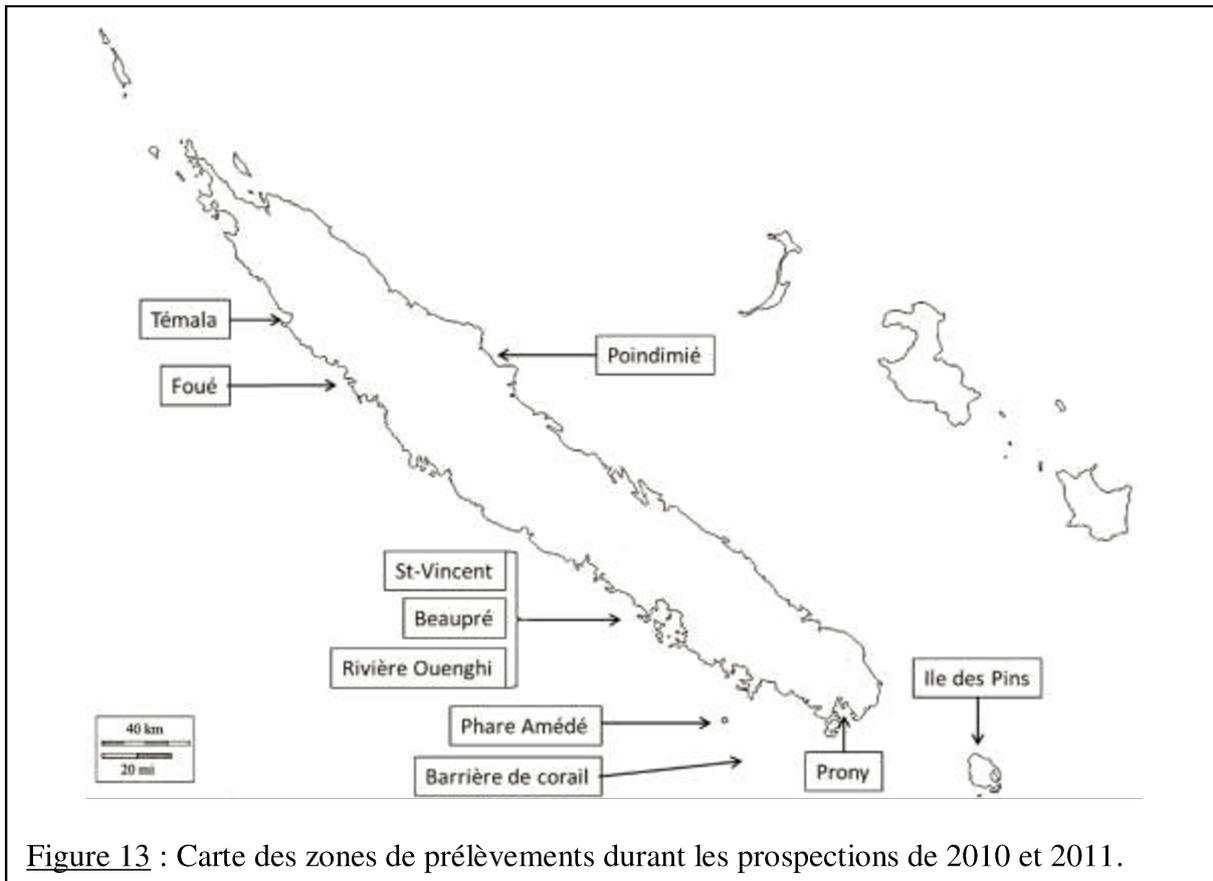


Tableau 5 : Identification des zones prospectées et des prélèvements associés.

Prospection I (2010)				Prospection II (2011)			
N° de site	Nombre de prélèvements	Nombre d'isolats	Zone	N° de site	Nombre de prélèvements	Nombre d'isolats	Zone
1	16	56	Foué	1	9	22	Prony
2	6	28		2	9	27	
5	24	65		Ile des Pins	3	9	36
3	20	69	4		17	62	
4	2	9	5		16	44	
6	3	4	Poindimié	6	22	44	Barrière de corail
7	14	40	Beauré				
8	6	7					
9	2	7					
10	29	52					
11	6 (pagode)	103	St-Vincent				
13	1	3					
12	36	43	Récif Phare Amédé				

A partir des prélèvements, 493 isolats ont été obtenus durant la première campagne et 278 durant la seconde pour un total de 771 isolats placés en collection.

2) Isolement et stockage des souches

a. Préparation des milieux de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu Zobell (ZoBell 1941) dont la composition est la suivante :

- 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure (Yeast Extract)
- 5 g.L⁻¹ de peptone
- 30 g.L⁻¹ de sel de mer (Sea Salt)

Pour les cultures liquides, le mélange est distribué dans des tubes en verre à raison de 8 mL par tube avant d'être autoclavé (30 min, 121°C). Pour la préparation des milieux gélosés, le milieu est additionné de 12 g.L⁻¹ d'Agar.

Les milieux sont conservés à 4°C jusqu'à 2-3 mois.

b. Culture et isolement des souches

- Au plus tôt après la mission sur le terrain, chaque échantillon prélevé est placé stérilement dans un milieu de culture Zobell liquide puis incubé à 27°C sous agitation (250 rpm) pendant 24h.
- À J+1, une goutte de culture est étalée sur milieu gélosé (boîte de Pétri) puis incubée à 27°C. Afin de pouvoir séparer au mieux les différents isolats, nous avons opté pour la

technique d'épuisement en strie qui permet d'obtenir plus facilement des colonies isolées.

- Un second repiquage est réalisé le lendemain, et reproduit jusqu'à l'obtention d'une colonie homogène (d'un point de vue phénotypique).
- Le repiquage de la colonie homogène est ensuite réitéré 3 fois à partir d'une colonie isolée afin de garantir la pureté de la souche.
- Au bout du 3e repiquage, la colonie pure estensemencée en milieu de culture Zobell liquide (27°C pendant 24h) puis placée en collection.

c. Conditionnement et stockage des isolats bactériens

Un cryoconservateur (glycérol 20%) est ajouté à la culture liquide afin de conserver l'intégrité de la souche lors de la congélation. La culture est répartie en cryotubes de 1 mL qui sont ensuite placés en collection à -80°C.

L'es isolats sont stockés à -80°C en duplicata à l'IPNC à Nouméa et à la station IFREMER de St-Vincent.

d. Détermination des optimums de croissance

La détermination des conditions optimales de culture est une étape clé, particulièrement en biotechnologie où le but est non seulement de maintenir en vie des organismes, mais également de rassembler les meilleures conditions permettant la production de substances valorisables.

Dans le cas présent, l'outil de production biotechnologique est le bioréacteur (ou fermenteur) et le matériel biologique, les bactéries marines. Ces dernières ont été récoltées dans des milieux intertidaux dits « atypiques » dont plusieurs paramètres (température, pH et salinité) ont été mesurés in situ, permettant ainsi de cibler les gammes de tolérance des micro-organismes.

Sur la base de ces données in situ, nous avons établi la gamme de paramètres expérimentaux suivante :

- $6 < \text{pH} < 9$ (avec un pas de 0,5).
- $20 < \text{température} < 45^{\circ}\text{C}$ (avec un pas de 5°C).
- $20 < \text{salinité} < 75 \text{ g.L}^{-1}$ (avec un pas de 10 g.L^{-1}).

Ainsi plusieurs milieux Zobell liquides ont été préparés afin de cultiver les souches d'intérêt sous ces différentes conditions.

Les conditions de croissance optimales concernant la température, la salinité et le pH ont été déterminées par le suivi de la croissance bactérienne réalisé par une mesure de la DO à 600 nm réalisée toutes les 30 minutes, et ceci jusqu'à stabilisation de la croissance. La courbe de croissance ainsi tracée, et la comparaison des pentes de chaque courbe permettent de déterminer la valeur optimale pour la croissance de chaque souche ([Tableau 6](#)). Plus de détails sont fournis dans l'article [ci-dessous](#) (Chalkiadakis et al. 2013). Au total 43 souches sélectionnées à l'issue du criblage ciblé vers la production de biopolymères (EPS, PHA) (ce criblage sera détaillé en début des parties III pour les EPS et IV pour les PHA) pour une étude des conditions optimales de croissances.

Ce suivi de croissance permet également de déterminer le cycle générationnel (temps de doublement d'effectif) et d'en déduire la durée des différentes phases de croissance en milieu liquide (phase stationnaire, début de croissance exponentielle, croissance exponentielle, etc.).

Les conditions de culture optimales seront appliquées lors de la production des biopolymères EPS et PHA en bioréacteur (Partie III et Partie IV).

Tableau 6 : Détermination des optimums de croissance pour les souches retenues à l'issue du criblage des EPS et des PHA (Parties III et IV).

Souche	Température (°C)	pH	Salinité (g.L ⁻¹)		
74	35	7,5	40	Prospection I	
94	35	7	35		
105	40	7	35		
117	40	7	40		
134	35	7	30		
173	25	7,5	40		
257	40	7	50		
274	30	7	50		
275	40	7,5	40		
282	35	7,5	60		
283	25	7	40		
298	40	7	35		
321	35	7	30		
336	40	7	40		
359	25	7	35		
365	35	7,5	40		
393	25	7	35		
403	40	7	40		
410	40	7	30		
412	25	7/7,5	50/60		
413	40	7	30		
456	30	7	50		
460	25	7,5 - 8	40/50		
470	35	7	50		
480	40	7,5	30		
490	25	7	40		
493	25	7	50		
542	35	7,5	30		Prospection II
557	40	7,5	30		
560	25	7,5	30		
563	35	7,5	50		
584	35	7,5	50		
588	40	7	40		
591	40	7	50/60		
592	40	7	50		
621	30	7,5	50		
631	35	7	50		
632	25	6,5	40		
636	35	8,5	30		
643	40	7,5	50		
666	25	7,5	60		
769	40	7,5	30		
770	40	7,5	35		

B. Identification et caractérisation des souches.

1) Présentation générale des recommandations

Afin de répondre à une demande pour l'élaboration de règles permettant d'attester de la présence d'une nouvelle espèce ou un nouveau genre bactérien, un comité international a été mis en place en 1987 (Wayne et al. 1987). Suite à ce comité, les premières règles de classification phylogénétique chez les procaryotes furent définies et complétées par un second comité en 1990 (Murray et al. 1990). Parmi les recommandations du comité, on retrouve la description des souches (description phénotypique, biochimique) mais également les techniques suivantes :

- Le séquençage de la totalité du génome (la technique de référence).
- L'hybridation ADN/ADN pour déterminer le pourcentage d'homologie génétique entre l'espèce étudiée et celle qui en est la plus proche (déterminée préalablement par une étude de la séquence ribosomique 16S dans le cas des bactéries). Les recommandations préconisent que pour une homologie supérieure à 70% les individus soient considérés comme appartenant à la même espèce, dans le cas contraire, on peut parler d'une nouvelle espèce (Stackebrandt and Goebel 1994).
- Le séquençage de la sous-unité ribosomique 16S (pour une séquence supérieure à 1300 pb). Les ribosomes sont des entités importantes pour la survie des organismes vivants de ce fait ces structures évoluent très lentement. C'est la vitesse de mutation génétique qui rend ce gène intéressant pour des applications phylogénétiques (notion d'horloge moléculaire). On estime ainsi qu'une homologie de séquence inférieure au seuil de 97% entre l'espèce étudiée et la plus proche est un élément renforçant l'hypothèse de la limite inter-espèce (Stackebrandt and Goebel 1994). Actuellement ce chiffre de 97% a été révisé à la hausse pour atteindre 98.7-99% (Stackebrandt E and J 2006).

Certaines techniques apportent des informations complémentaires de caractérisation qui peuvent être exigées ou préconisées par certains journaux spécialisés en phylogénie. Parmi ces caractérisations complémentaires, on retrouve l'analyse des lipides ou encore le calcul du %G+C.

La découverte d'un grand nombre d'espèces bactériennes a très vite montré des limites inter-espèces de plus en plus étroites et le besoin de faire appel à de nouvelles techniques complémentaires. Ainsi un nouveau comité a été mis en place en 2002 pour réévaluer les critères de définition de nouvelles espèces (Stackebrandt et al. 2002) en tenant compte des nouvelles découvertes et des avancées technologiques. De nouvelles techniques ont ainsi été retenues :

- La technique du MLST (Multi Locus Sequence Typing) qui consiste à séquencer des gènes de ménage (House-Keeping genes). L'évolution de ces gènes est plus rapide que celle de la sous-unité ribosomique 16S et est applicable pour des comparaisons entre organismes d'un même genre (Naser et al. 2005; Martens et al. 2008). On retrouve souvent dans les articles le séquençage d'au moins quatre gènes en complément de la sous-unité 16S permettant de réaliser une analyse phylogénétique plus poussée (Naser et al. 2005; Thompson et al. 2005).
- La technique du « profiling de l'ADN » par Rep-PCR, pour déterminer des séquences répétées en utilisant des amorces spécifiques (la plus connue étant la GTG5: 5'GTG GTG GTG GTG 3'). À partir du nombre de régions répétées et de la taille des amplicons, il est possible d'établir des liens entre les espèces et même de faire des arbres phylogénétiques.
- L'analyse du culot bactérien par mesure infrarouge (IRFT). Cette technique se présente comme un substitut à l'analyse de la composition en lipide par CLHP. La IRFT est une technique rapide permettant d'obtenir des spectres afin d'établir des comparaisons. L'avantage de cette technique est que l'appareil n'est pas dédié à ce seul usage contrairement à l'LC-MS (Helm and Naumann 1995). Plusieurs équipes ont également utilisé des spectres de IRFT pour construire des arbres phylogénétiques (Winder et al. 2006).

Les autres techniques admises sont la détermination du point de fusion qui permet de recueillir des informations sur le %G+C et la mesure du ΔT_m qui s'affichent comme des substituts à la technique d'hybridation ADN/ADN

2) Le mode opératoire

Dans l'optique d'une valorisation potentielle des molécules, il est important d'identifier d'un point de vue taxonomique la souche productrice. Cette identification peut renseigner sur l'éventuelle pathogénicité de la souche et sur ses conditions optimales de croissance. En outre, cette information peut aider à la compréhension du lien existant entre la nature/composition du polymère et la position taxonomique de l'organisme producteur.

Dans cette perspective, plusieurs outils ont été mis en place au cours de cette étude, commençant par une description phénotypique des colonies bactériennes suivie de tests biochimiques classiques.

Concernant la totalité des isolats de la collection de Nouvelle-Calédonie, une description phénotypique consistant en l'observation des colonies après 24h à 48h sur milieu Zobell gélosé a été réalisée.

Seules les souches présentant un intérêt potentiel pour la production de biopolymères (identifiées suite au criblage détaillé en Partie III et IV) ont ensuite fait l'objet d'une description phylogénétique complémentaire.

III. Matériel et méthodes

A. Les premiers éléments de description

Cette première partie décrit un ensemble d'étapes utilisées pour réaliser une première description des souches bactériennes d'intérêt:

1) Les descriptions phénotypiques

La description phénotypique est un prérequis pour la publication de nouvelles espèces (Wayne et al. 1987). De plus, étant donné la possibilité de redondance des isolats, l'inventaire phénotypique des souches (forme, aspect, couleur et autres critères morphologiques), lors de la mise en culture sur milieu solide, peut constituer un premier élément aidant à la sélection ou la différenciation des isolats. L'ensemble des bactéries de la collection de Nouvelle-Calédonie a ainsi été cultivé sur milieu gélosé et les colonies ont été décrites d'un point de vue phénotypique.

2) Les caractérisations biochimiques

Les caractéristiques biochimiques sont des critères essentiels à l'identification des espèces bactériennes et ont été déterminées sur les 43 souches intéressantes pour notre étude.

a. La coloration de Gram

Cette technique mise au point en 1884 par Christian Gram permet de réaliser une première caractérisation concernant la nature de la paroi bactérienne. Le principe de cette technique vise à mettre en évidence par coloration, la présence de peptidoglycane caractéristique des bactéries Gram positif. Certaines bactéries possèdent une couche lipidique sur la partie externe de la cellule ainsi qu'une paroi de peptidoglycane plus fine, ce sont les bactéries Gram négatif. Le protocole de coloration consiste à fixer les bactéries avant de mettre en évidence leur cytoplasme grâce à une action combinée du violet de gentiane et du Lugol qui forment un complexe chimique intracellulaire colorant ainsi les cellules en violet. Le rinçage à l'alcool permet d'éliminer ce complexe chez les bactéries Gram négatif qui deviennent incolores, mais pas chez les Gram positif qui conservent une coloration violette. La dernière étape vise à colorer les Gram négatif potentiels par une recoloration à la fuchine qui va donner une coloration rose.

Protocole :

Prélever une colonie de la culture et déposer sur une lame. Sécher la lame au-dessus bec bunsen. Recouvrir la lame d'alcool pour fixer le prélèvement. Incliner la lame et verser du violet de gentiane, laissé agir 1 minute. Rincer à l'eau distillée. Incliner la lame et recouvrir de la solution de Lugol. Laisser agir 30 secondes puis rincer à l'eau distillée. Verser quelques gouttes d'alcool sur la lame puis rincer à l'eau distillée. Pencher la lame et recouvrir de fushine. Laisser agir 10-20 secondes puis rincer à l'eau distillée. Observer au microscope optique après avoir recouvert la lame d'huile à immersion.

b. Les tests catalase/oxydase

La catalase (ou hydroperoxydase) est une enzyme généralement présente chez les organismes aérobies ; elle catalyse les réactions d'oxydation et intervient donc dans la respiration. La majorité des bactéries Gram négatif possèdent cette enzyme (elles sont dites catalase +) ; ce test est donc utilisé pour les différencier des bactéries à Gram positif (Chelikani et al. 2004). De par son rôle naturel d'oxydant, la catalase réagit avec le peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée). Ainsi, pour révéler la présence de catalase, une colonie isolée est mise en contact avec le peroxyde d'hydrogène, la formation de bulles est recherchée (dégagement gazeux).

Le test oxydase vise à déterminer la présence de l'enzyme du cytochrome C oxydase qui jouent un rôle important dans la production d'énergie. Le test va mettre en évidence la présence de l'enzyme par l'utilisation d'un indicateur redox (TMPD ou DMPD). Le transfert d'électron, s'il a lieu, va oxyder le réactif préalablement mis en contact avec une colonie isolée et générer une couleur bleu foncée (Steel 1961). Pour ce faire nous avons prélevé une colonie du milieu de culture et nous l'avons déposée sur un papier buvard avant d'ajouter quelques gouttes de réactif.

La réaction est immédiate pour les deux types de tests.

c. Les galeries API

Les galeries API (Appareillage et Procédé d'Identification) permettent l'identification de micro-organismes par la réalisation de tests biochimiques miniaturisés. Afin d'orienter le choix de la galerie API, il est nécessaire de réaliser au préalable les tests de coloration de Gram et oxydase-catalase. En fonction des résultats obtenus dans les micro-galeries, un code chiffré est attribué permettant d'identifier la bactérie étudiée, si cette dernière est référencée. En cas de non-identification, ces tests permettent de donner des éléments de description de la bactérie grâce aux substrats/enzymes qui auront été révélés.

Protocole:

L'isolat bactérien est cultivé sur un milieu gélosé pendant 24h (étalement en cadrant) puis quelques colonies sont reprises dans un milieu de suspension (variable selon le type de galerie) pour un indice de 0,5 McF puis diluées dans des milieux spécifiques pour être dispensées dans les alvéoles de la micro-galerie. Les métabolites produits durant la période d'incubation réagissent alors avec leurs substrats déshydratés provoquant la libération d'un pigment de couleur. Ce phénomène peut être spontané ou révélé par l'addition de réactifs après 24h d'incubation, dans notre cas, à 30°C.

Durant cette étude, les isolats appartenant aux genres *Vibrio*, *Pseudomonas* et *Pseudoalteromonas* ont été testés sur les galeries suivantes :

API 20^E : ce sont les premiers types de galeries développées et permettent l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif.

API 20^{NE} : pour les bacilles à Gram négatif oxydase positif

API 50^{CH} : est destiné à l'identification des *Bacillus* et apparentés et des bacilles à Gram négatif appartenant aux *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*. Le milieu est prêt à l'emploi et permet l'étude de la fermentation des 49 sucres et est souvent utilisé en complément de la galerie API 20^E

ATB ^{G-} : permet de déterminer la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries et comporte 16 paires de cupules afin de tester la souche sur différents antibiotiques. Le résultat obtenu dans chaque galerie permet de catégoriser la souche selon ses propriétés en sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique.

ATB ^{PSE} : permet de déterminer la sensibilité des *Pseudomonas* et bacilles à Gram négative non-fermentant et comporte 16 paires de cupules contenant des antibiotiques à une ou deux concentrations.

B. Les outils en biologie moléculaire

1) Le séquençage génétique

Une étude phylogénique a été menée sur les 17 souches présentant un intérêt potentiel pour la production de biopolymères (identifiées suite au criblage détaillé en Partie III et IV) Cette étude fait appel à différents outils de biologie moléculaire.

a. Extraction de l'ADN

Le kit d'extraction Qiagen (QIAmp Qiagen) permet l'extraction de l'ADN à partir de bactéries en culture liquide ou solide. L'échantillon (une à deux colonies) est mis à chauffer (55°C pendant 20 min) avec un tampon de lyse AL (200 µL) et une protéinase K (20 µL) qui vont permettre de lyser les cellules et de libérer l'ADN dans le milieu. L'échantillon est centrifugé dans une colonne de purification (1 min à 8000 rpm) et nettoyé avec différents tampons de lavage (AW1 et AW2) avant d'être élué dans le tampon d'élution AE à une température de -20°C. Cette méthode d'extraction permet d'optimiser la concentration et la qualité de l'ADN.

b. La préparation du séquençage

Il existe plusieurs étapes préalables au séquençage, tout d'abord une phase d'amplification du gène d'intérêt (PCR classique), puis une étape de purification du produit amplifié et enfin une seconde amplification à l'aide d'un kit de séquençage contenant des bases nucléotidiques fluorescentes. Les amorces utilisées pour le séquençage 16S et MLST sont détaillées dans le tableau ci-dessous ([Tableau 7](#)).

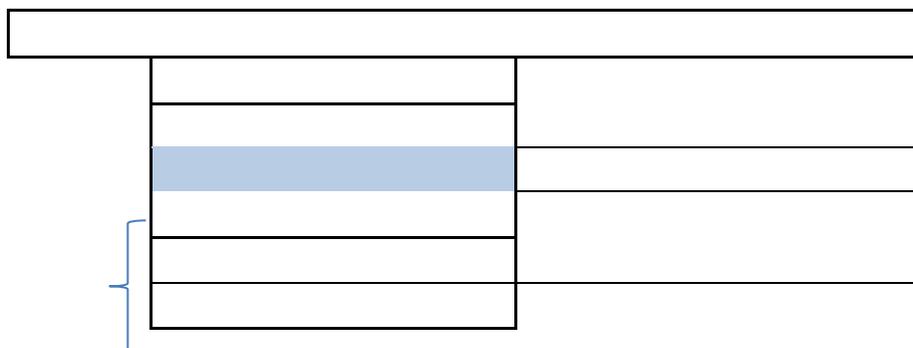
• L'amplification génétique

Dans le cas de l'amplification 16S, nous avons eu recours au couple d'amorces Sadir-S17REV (1400 pb) et si nécessaire nous avons utilisé le couple 16SUF1-16SUR2 (amorces internes 800 pb) ce qui nous a permis d'obtenir une séquence d'ADN 16S de plus de 1400pb. La liste des couples d'amorces utilisées dans le cadre de l'identification phylogénétique (16S et MLST) est détaillée dans le tableau ci-dessous (Tableau 7) :

Tableau 7 : Enumération détaillée des spécificités concernant les amorces utilisées (a) ainsi que le programme d'amplification PCR (b).

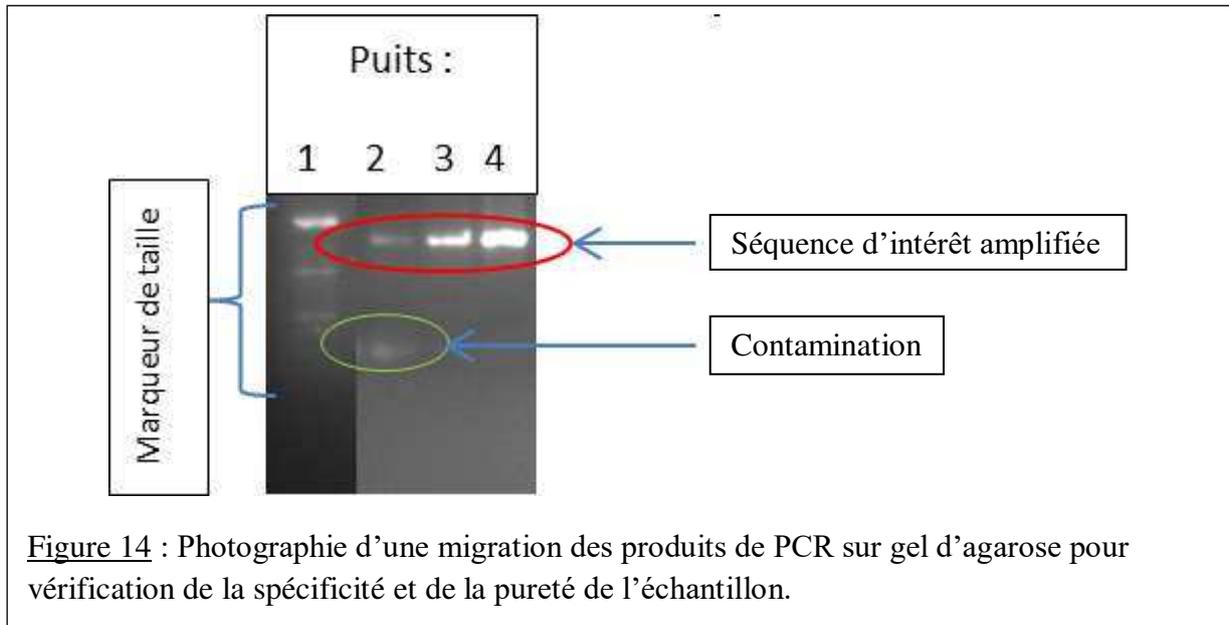
(a)

(b)



- La purification des amplicons

Une fois la PCR réalisée, les amplicons sont déposés sur gel d'agarose et soumis à migration. Cette étape permet de vérifier la pureté et la spécificité de l'amplification par la taille de l'amplicon (Figure 14).



Le fragment amplifié est ensuite purifié (QIAGEN® MinElute) afin d'éliminer de l'échantillon le restant d'enzymes, d'amorces et tous les résidus du mix de PCR issus de la première amplification, ceci afin d'éviter toute interaction avec la réaction de séquence.

La concentration de l'ADN est alors mesurée et doit être à proche de $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ avant de réaliser la réaction de séquence. La mesure de la concentration d'ADN est un facteur important pour garantir le succès du séquençage ; en effet le séquençage nécessite une quantité minimale d'ADN pour la réaction de séquence. Il est recommandé pour des séquences entre 1000-2000 pb d'avoir une quantité d'ADN comprise entre 10-40 ng.

- La réaction de séquence

Le principe est le même que pour une PCR classique à la différence que l'on utilise qu'une seule amorce par mix, les amorces utiliser étant identiques à celles de la première PCR. Pour chaque réaction de séquence il faut donc préparer deux mix : une pour l'amplification en 5'-3' et une pour celle en 3'-5'.

La réaction de séquence se fait avec le kit ABI Prism BigDye Terminator v3,1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems©) qui contient un mélange de nucléotides marquées avec un fluorochrome et la polymérase (premix) ainsi que le tampon réactionnel (BigDye sequencing buffer). Les mélanges à effectuer sont décrits dans le [Tableau 8](#) ainsi que le programme d'amplification PCR utilisé lors de la réaction de séquence.

Tableau 8 : Description des différents mélanges à réaliser lors d'une réaction de séquence avec la préparation d'un mix par amorce (a) et détail du programme d'amplification PCR à respecter selon les recommandations du fabricant (b)

(a)

μL	<i>Produit</i>	μL	<i>Produit</i>
0,50	Premix	0,50	Premix
4	BigDye Sequencing Buffer	4	BigDye Sequencing Buffer
0,32	Amorce F (10 μM)	0,32	Amorce R (10 μM)
14,18	H ₂ Oppi	14,18	H ₂ Oppi
19	<i>Mix a aliquoté</i>	19	<i>Mix a aliquoté</i>

19 μL Mix + 1 μL échantillon

(b)

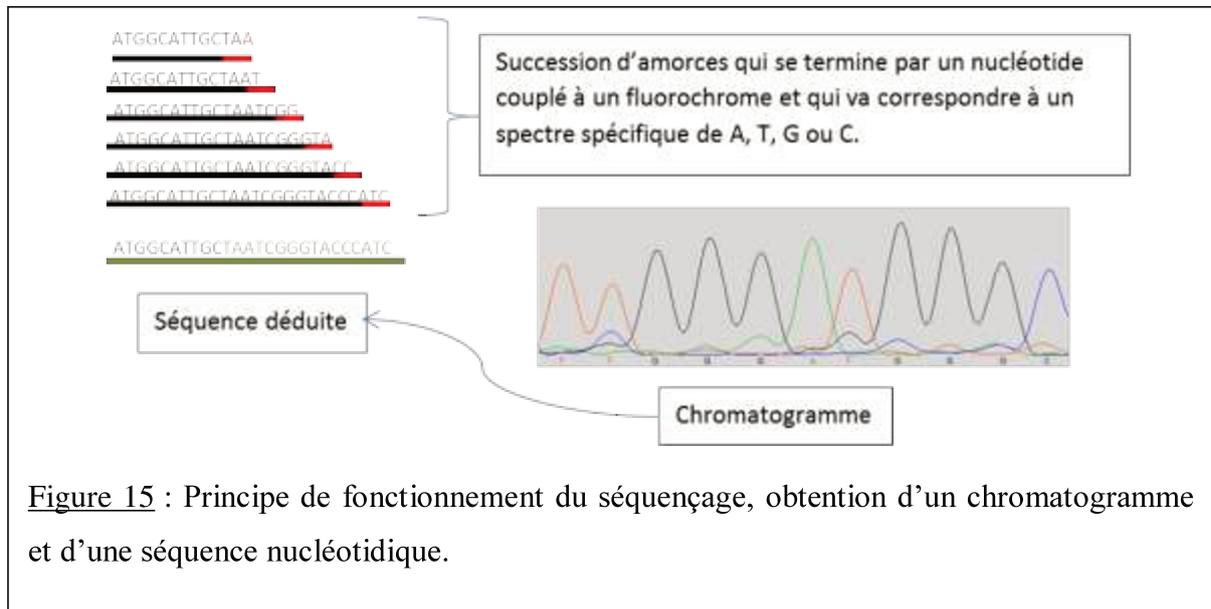
96°C – 1min	} 60 cycles
96°C – 10sec	
50°C – 5sec	
60°C – 4min	
4°C - ∞	

- La purification des produits de séquences

Une fois la réaction de séquence réalisée, il est nécessaire d'éliminer les composés résiduels du mélange qui pourraient interférer dans la lecture des séquences (les bases nucléotidiques fluorescentes non hybridées risquent en effet d'engendrer un signal de mauvaise qualité). Pour cela, nous avons recouru à la méthode d'inclusion /exclusion (Séphadex) avec une séparation en fonction de la taille (encombrement) des molécules. Les molécules de plus grandes tailles, qui correspondent aux séquences amplifiées, traversent la résine tandis que celles de plus petites tailles (nucléotides non hybridés) restent piégées. La résine Séphadex (G50) sèche est d'abord déposée sur une plaque 96 puits prévue à cet effet, puis hydratée (250µL eau milliQ) sur une nuit. Le volume mort est ensuite élué (5 min centrifugation à 2500 rpm). Le produit de la réaction de séquence (20µL + 10µL eau milliQ) est déposé sur la plaque contenant la résine hydratée puis centrifugée (2000 rpm, 5 min) ; le filtrat contenant les séquences est récupéré sur une plaque de lecture 96 puits.

- Principe du séquenceur

Le séquençage a pu être réalisé au niveau de la Plate-Forme du Vivant de Nouvelle-Calédonie (PFV-NC) sur le séquenceur ABI 3130 xl (ABI PRISM®). Les amplicons générés précédemment durant la PCR, sont de tailles variables ; ceci est dû à la présence en partie terminale d'un nucléotide couplé à un fluorochrome qui stop l'amplification. La lecture successive de ces fragments permet de déduire la séquence nucléotidique de la zone amplifiée en générant un chromatogramme (Figure 15).



2) Les analyses phylogénétiques

L'étude phylogénétique et les logiciels de traitement de données.

- Staden Package :

Ce logiciel (gratuit et disponible sur <http://staden.sourceforge.net>) permet de nettoyer les chromatogrammes : vérifier la lecture du séquenceur vis-à-vis des spectres obtenus et, selon les cas, de corriger quelques ambiguïtés.

- BioEdit :

Il s'agit d'un logiciel de traitement de séquences (gratuit sur le site : <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) qui permet d'aligner et de comparer tout un panel de séquences, étape préalable à l'élaboration d'un arbre phylogénétique (Hall 1999). Grâce aux nombreuses applications de BioEdit, nous avons pu rabouter et relier les séquences forward (5'-3') et reverse (3'-5'), et aligner la séquence obtenue avec un panel de séquences obtenues via des bases de données (ex : GenBank).

- Phylo_win :

Ce logiciel (gratuit et disponible sur http://pbil.univ-lyon1.fr/software/phylowin_legacy.html) permet de générer des arbres phylogénétiques en appliquant différentes méthodes de calcul des distances entre les séquences des espèces (Galtier et al. 1996). Dans le cadre de ce travail, les arbres phylogénétiques obtenus à partir des séquences 16S de 17 isolats ont été générés en utilisant le modèle de correction développé par Kimura (Kimura 1985) appliqué à la technique du neighbour-joining (NJ) sur 500 répliques. En effet ces deux paramètres sont classiquement utilisés. Le NJ est présenté comme une méthode fiable et rapide reflétant le mieux la réalité évolutive (détermination de la taille des branches et de la valeur des bootstraps) grâce à son algorithme permettant de traiter les données de plusieurs centaines de taxons (Saitou and Nei 1987). La correction de Kimura est basée sur la théorie neutraliste de l'évolution, c'est-à-dire qu'elle prend en compte le fait que les mutations peuvent entraîner des changements au niveau moléculaire avec une incidence neutre (tout dépend du lieu de mutation). Ainsi selon cette théorie, la mutation ne conduit pas nécessairement à la complexification des organismes (Kimura 1985). La correction de Kimura est couramment retrouvée dans le cadre d'études phylogénétiques chez les procaryotes.

3) Les techniques moléculaires alternatives dans l'étude et l'identification des espèces bactériennes

Le principe de l'hybridation ADN/ADN au sens classique du terme consiste à marquer radio-activement l'ADN d'un hétérodimère formé à partir d'une souche étudiée et d'une souche type de référence afin d'estimer le degré d'homologie de séquence entre les deux brins (Ley et al. 1970). Cette estimation est exprimée en pourcentage d'appariement et donne des informations sur la proximité génétique des espèces. Plus l'appariement est élevé, plus les séquences génétiques sont similaires donc plus les souches sont phylogénétiquement proches.

Une alternative à cette technique est **la détermination du ΔT_m** c'est à dire la détermination des différences pouvant être observées entre les points de fusion (ou températures de fusion, T_m) de différents brin d'ADN. Le ΔT_m peut être calculé par une utilisation détournée de la PCR en temps réel, « real time PCR » (ou RT-PCR). Une des caractéristiques de cet outil est de permettre de mesurer la proportion d'ADN double brin en temps réel grâce à un marqueur fluorescent (LC-Green ou SYBR Green I) émettant une longueur d'onde bien spécifique lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin. Le comité « add hoc committe » de 2002 (Stackebrandt et al. 2002) préconise que la limite inter-espèce bactérienne est atteinte lorsque l'on observe un ΔT_m à 50% supérieur à 5°C.

L'utilisation de cette technique a été mise en place pour compléter l'étude phylogénétique de la souche NC470.

a. Détermination du % G+C

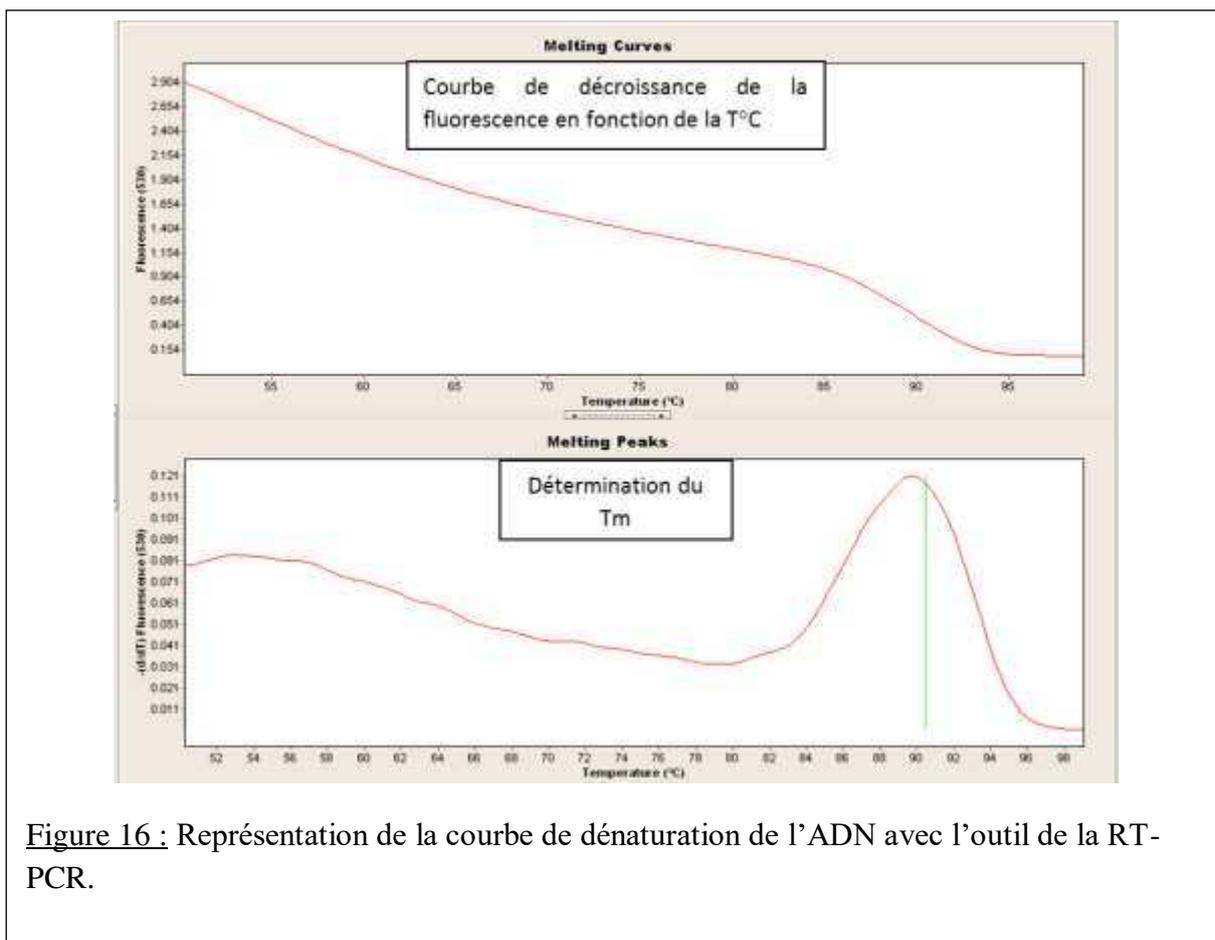
Une étape préalable à la détermination du ΔT_m est le calcul du % G+C de l'espèce étudiée.

L'ADN est composé de bases azotées puriques et pyrimidiques (ATGC) qui s'apparient entre elles via des liaisons hydrogènes (2 et 3 respectivement pour les liaisons A-T et G-C) ; ces liaisons se fragilisent sous l'influence de la température au-delà d'un certain seuil. Le désappariement des doubles brins d'ADN par l'augmentation de la température apporte des indications sur la nature des bases azotées qui composent l'ADN. Le %G+C reflète la proportion estimée de guanine et de cytosine sur l'ensemble du patrimoine génétique de l'espèce étudiée : plus les gènes de l'espèce considérée contiennent de bases G et C, plus l'association des brins d'ADN est forte et donc plus la température de dissociation devra être élevée. Connaître ces données peut se révéler important dans le cadre d'une caractérisation d'espèce car on retrouve généralement pour un genre bactérien donné une gamme de %G+C qui lui est propre (Freese 1962; Xu et al. 2000; Hildebrand et al. 2010).

La RT-PCR utilise un marqueur fluorescent (dans notre cas le LC Green) qui va s'insérer entre les doubles brins d'ADN et émettre une fluorescence mesurable par l'appareil (Light Cycler 2 de ROCHE ou LC2). L'observation de la courbe de dénaturation de l'ADN bactérien est en général assez caractéristique avec une décroissance plus ou moins linéaire au départ,

suivi (en général au-delà de 50°C) d'un point de chute avec une diminution rapide de la fluorescence. Pour déterminer le %G+C de l'espèce étudiée, nous avons généré une courbe de dénaturation permettant de déterminer le T_m (Figure 16) d'espèces de références (dont les valeurs de %G+C sont connues) appartenant au même genre que l'espèce étudiée. L'ensemble des données recueillies nous permet de générer une gamme étalon exprimant le %G+C en fonction du T_m (Tableau 9) et de tracer une droite des tendances (Figure 17). C'est à partir de la pente de cette droite que nous pouvons calculer le % GC une fois que la valeur du T_m est déterminée (Xu et al. 2000; Moreira et al. 2010).

Les détails concernant le programme utilisé pour la mesure de la fluorescence sont précisés dans l'article ci-dessous (Chalkiadakis et al. 2013). Ce protocole a été inspiré à partir de plusieurs travaux réalisés au cours de ces dernières années (Xu et al. 2000; Gonzalez and Saiz-Jimenez 2002; Moreira et al. 2010).



b. La détermination du ΔT_m

Le but de la technique est d'observer et de comparer la manière dont se dénaturent des échantillons d'ADN, en particulier le seuil de température à partir duquel on peut observer 50% de déshybridation.

Afin d'établir des comparaisons inter-espèces, nous avons utilisé un hybride d'ADN comportant un brin issu de l'espèce étudiée et un autre brin d'une espèce de référence. L'espèce de référence a été estimée comme étant la plus proche au regard des données et conclusions obtenues avec le séquençage réalisé en amont. Une fois l'hybride formé, le protocole de dénaturation des échantillons d'ADN peut être appliqué sur la RT-PCR, une courbe est ainsi générée par mesure de la fluorescence.

i. La création d'un hybride

L'hybride (ou hétéroduplex) est généré dans des conditions particulières avec tout d'abord une phase de **déshybridation** (dissociation des deux types d'ADN db) suivi d'une phase de **renaturation** (à température optimale de renaturation (T_{or})) et enfin une étape de stabilisation par décroissance lente et graduelle de la température pour une **réhybridation**. Selon les études réalisées par l'équipe de Ley (Ley et al. 1970), il y aurait une température optimale de renaturation (T_{or}) pour ce type d'expérience, que l'on peut exprimer par la formule suivante : $T_{or} = 0.51 (G + C) + 47$.

Le % G+C des *Vibrios* étudiés se situe entre 45 et 50%, ce qui amène la T_{or} aux alentours de 70°C. En s'inspirant de ce qui a été réalisé par l'équipe de Moreira (Moreira et al. 2010), nous avons pu mettre en œuvre ces expériences avec l'élaboration d'un programme permettant de réaliser les différentes phases énumérées ci-dessus, le protocole est détaillé dans l'article ci-dessous (Chalkiadakis et al. 2013).

ii. La mise en forme des données

Une fois l'hétéroduplex généré, les échantillons sont couplés au fluorochrome puis analysés par le RT-PCR en subissant une dénaturation lente. Le programme est le même que

celui utilisé pour la détermination du % G+C. On peut ainsi observer l'évolution de la courbe de dénaturation, récupérer les données relatives à la fluorescence et les convertir en pourcentage afin d'établir un graphique de dénaturation. Le graphique exprimera le pourcentage de dénaturation (ou fluorescence) en fonction de la température (Figure 18). A partir de ces données, nous pouvons déterminer avec une grande précision la température correspondant à 50% de la fluorescence pour chacun des trois échantillons. Le calcul du ΔT_m consiste à déterminer quel écart de température existe entre l'hybride généré préalablement et les deux brins parentaux lorsque 50% de la dénaturation est atteinte. Si cette différence est supérieure à 5°C, selon les recommandations de 2002 (Stackebrandt et al. 2002), nous atteignons la limite inter-espèce.

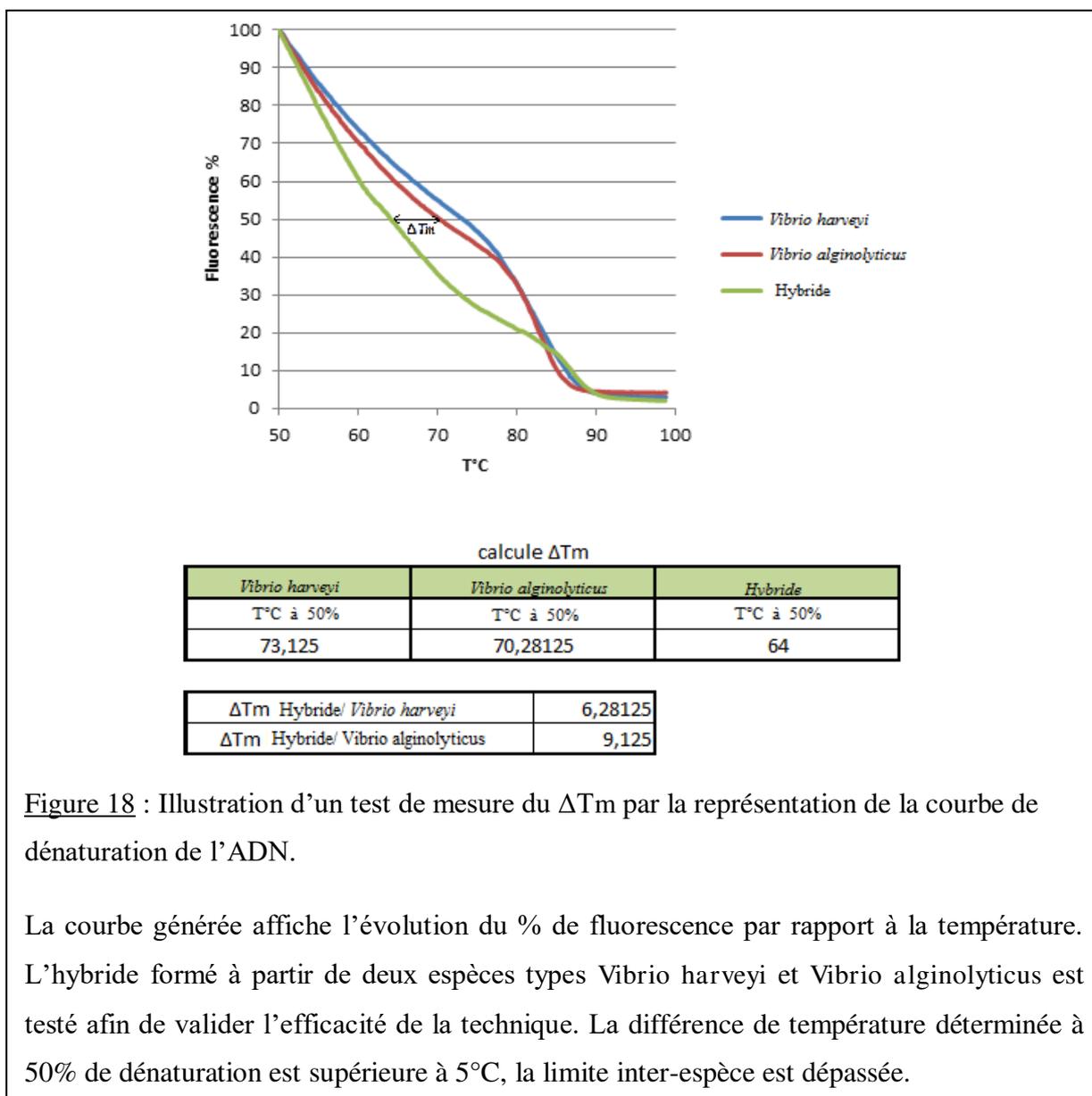


Figure 18 : Illustration d'un test de mesure du ΔT_m par la représentation de la courbe de dénaturation de l'ADN.

La courbe générée affiche l'évolution du % de fluorescence par rapport à la température. L'hybride formé à partir de deux espèces types *Vibrio harveyi* et *Vibrio alginolyticus* est testé afin de valider l'efficacité de la technique. La différence de température déterminée à 50% de dénaturation est supérieure à 5°C, la limite inter-espèce est dépassée.

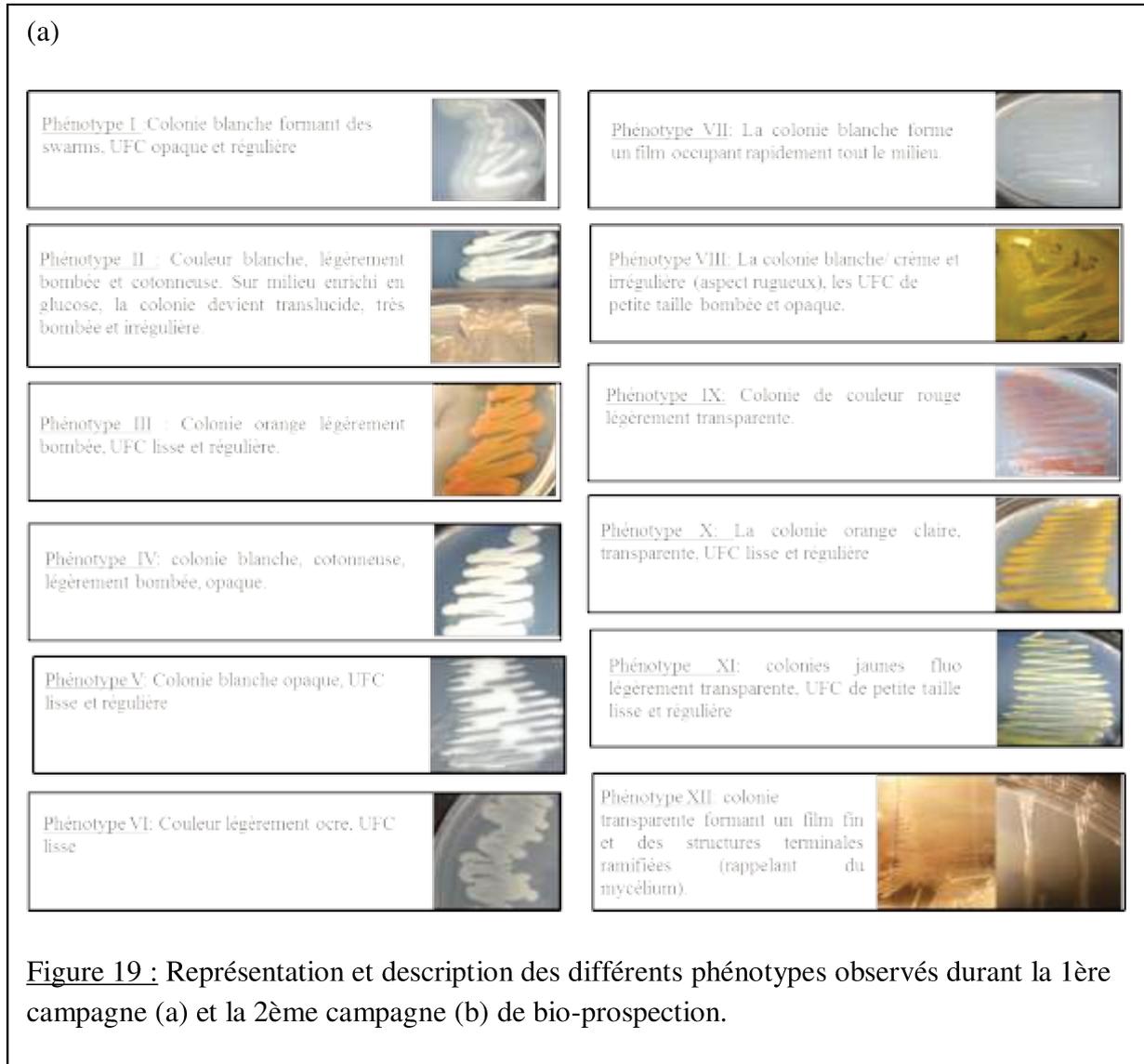
IV. Résultats et discussion

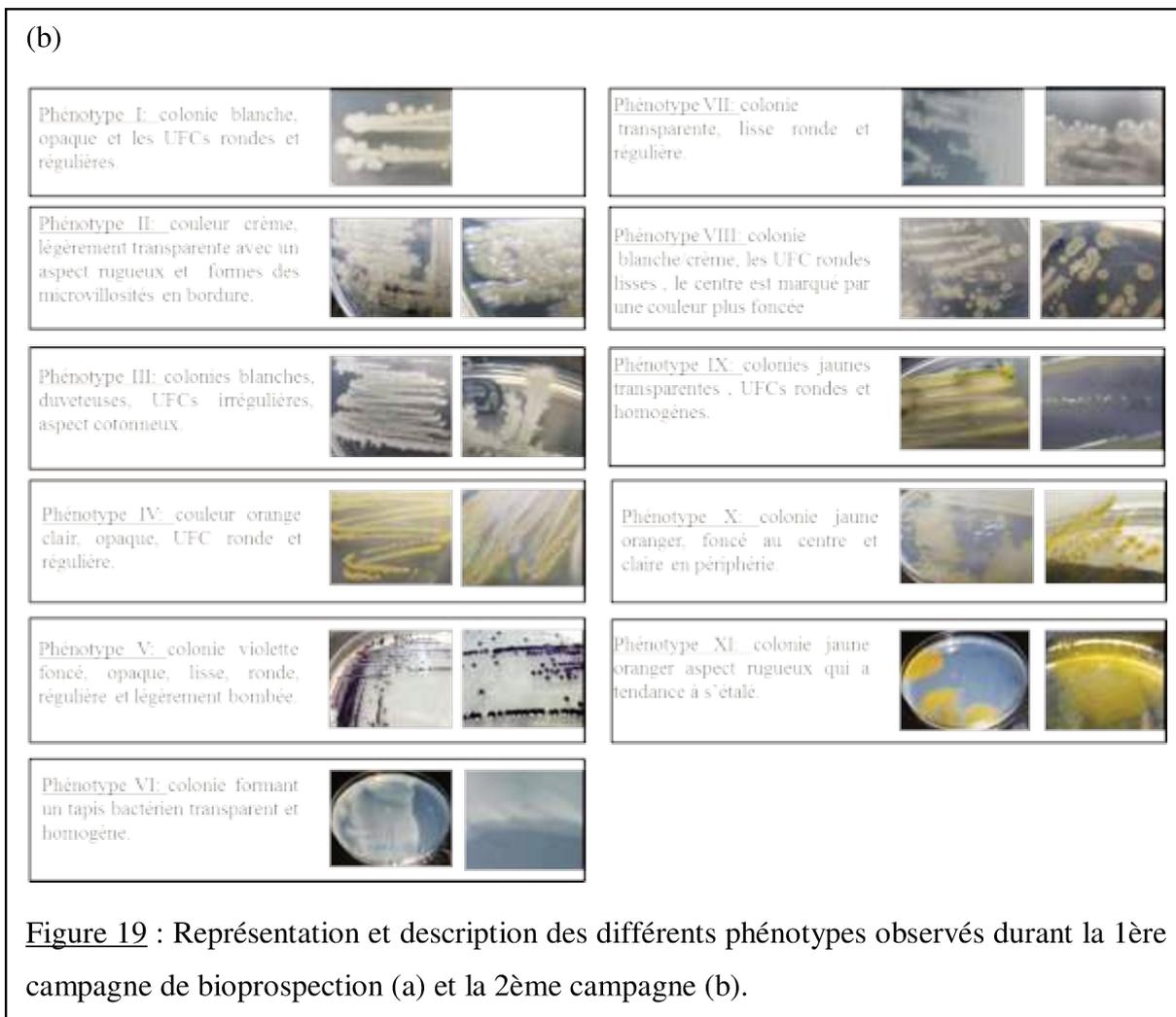
Les campagnes de prospections réalisées en Nouvelle-Calédonie ont permis de générer une collection de 771 isolats bactériens marins prélevés sur les milieux intertidaux de la Grande Terre (essentiellement sur la côte ouest) et de l'île des Pins. Les biotopes prospectés étaient très variés et répondaient tous au critère de milieux atypiques, c'est-à-dire des zones à fortes variations de facteurs abiotiques (température, pH, salinité, exposition UV). Ainsi une grande variété de milieux intertidaux a été explorée durant les campagnes d'avril 2010 avec la mise en collection de 493 isolats et 278 isolats en avril 2011.

L'identification des souches bactériennes est un critère nécessaire si l'on envisage une valorisation biotechnologique des molécules issues de cette souche. D'autre part, cette identification peut renseigner sur l'éventuelle pathogénicité de la souche et sur les conditions optimales nécessaires à sa croissance. Enfin, cette information peut constituer un élément de réflexion dans le cadre d'études chimiotaxonomiques visant à établir un lien entre une espèce ou un genre bactérien et la structure/composition chimique des molécules produites.

Dans cette perspective, nous avons utilisé plusieurs outils permettant d'aboutir à l'identification des souches bactériennes.

En premier lieu, nous avons procédé à une description phénotypique de l'ensemble des isolats de la collection de Nouvelle-Calédonie. Pour chaque isolat, sont précisés le phénotype (phénotype I, II, III, etc...), l'identifiant ainsi que le lieu de prélèvement. Au total 12 phénotypes différents ont été déterminés pour les isolats récoltés au cours de la première campagne et 11 pour la seconde campagne ([Figure 19](#)).





Seules les souches présentant un intérêt pour la production de biopolymères (EPS et PHA) ont été caractérisées plus précisément. Ainsi, sur les 43 isolats sélectionnés suite aux phases de criblages, 17 ont été observés en microscopie afin de décrire leur forme (bacille, bâtonnet, coque) et leur mobilité (le type de mobilité donnant des indications sur la présence de cils ou de flagelle). Ils ont été caractérisés par des tests biochimiques et par biologie moléculaire pour une identification partielle (analyse de la sous-unité ribosomique 16S) (Tableau 10). Ces 17 isolats ont été retenus car ils semblaient être les plus intéressants à étudier. Dans le cas des bactéries potentiellement productrices d'EPS, c'est la capacité de croissance rapide sur milieu gélosé enrichi en glucose et/ou l'aspect muqueux plus prononcé qui a permis de sélectionner les isolats (Partie III/I/A : Le criblage des souches). Dans le cas des bactéries potentiellement productrices de PHA, la sélection a été réalisée en fonction des

générés mesuraient entre 4211 et 4247 pb et étaient constitués des séquences 16S rDNA ainsi que des gènes gapA, gyrB, pyrH et topA (Tableau 11) (Figure 20).

Tableau 11 : Récapitulatif de la taille des séquences génétiques obtenues pour les isolats appartenant au genre *Vibrio*.

Figure 20 : Arbre des *Vibrio* établi à partir d'un concatémère formé des séquences de la sous-unité ribosomique 16S et des gènes de ménage *gapA*, *gyrB*, *pyrH* et *topA*.

L'arbre a été formé en utilisant le modèle de correction de Kimura appliqué à la technique du neighbour-joining (NJ) (sur 500 répliques) ; les bootstraps supérieurs à 75 sont indiqués.

A. Les organismes producteurs d'EPS

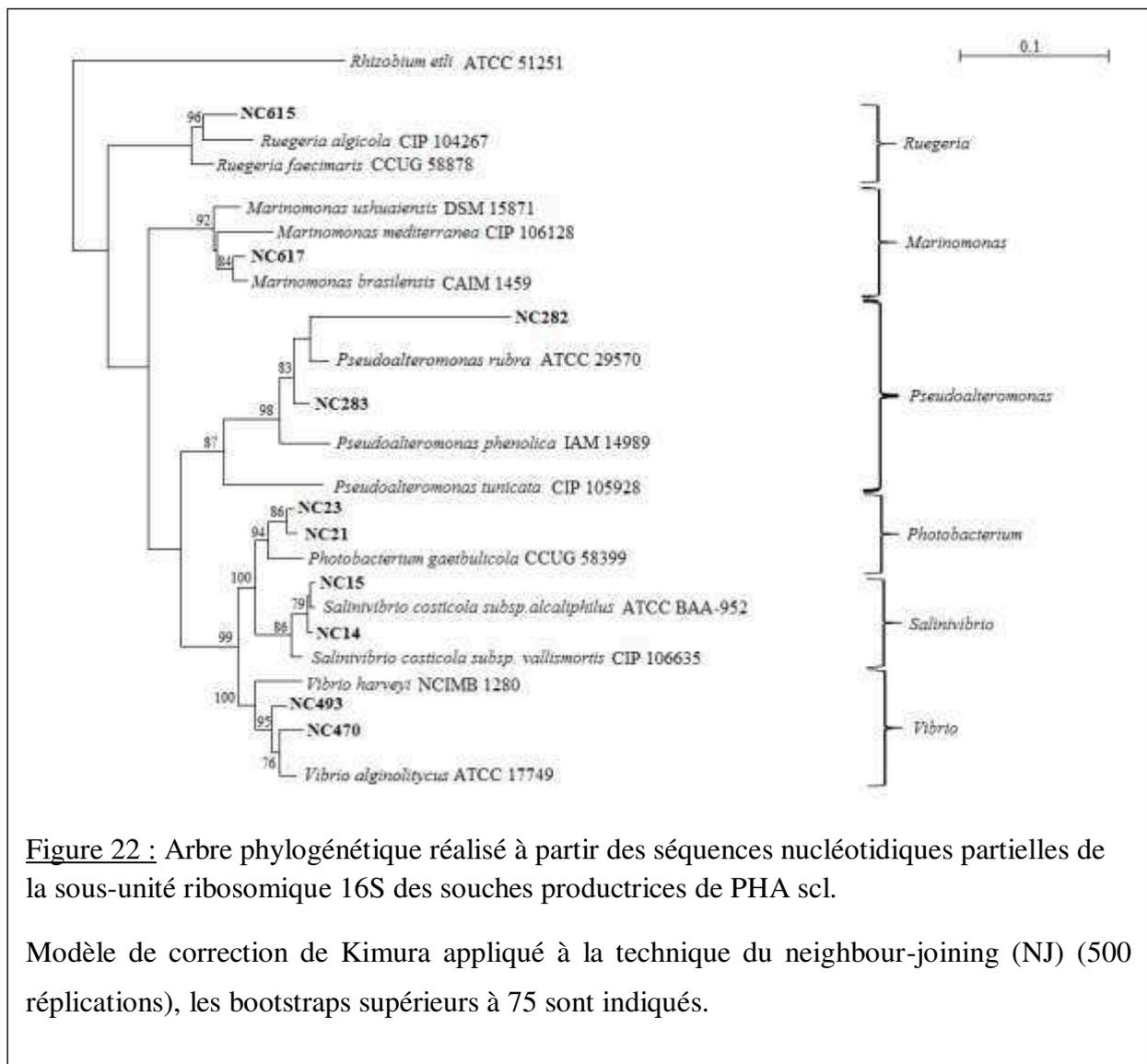
Dix isolats produisant des EPS ont été caractérisés. Trois genres bactériens ont été déterminés : *Vibrio* (8), *Pseudoalteromonas* (1) et *Ruegeria* (1) (Figure 21). Ces genres sont connus pour regrouper un grand nombre d'espèces marines. Les espèces du genre *Vibrio* ont un potentiel de production d'EPS qui est déjà largement décrit dans la littérature (Raguenees et al. 1997a; Wai et al. 1998; Enos-Berlage and McCarter 2000; Muralidharan and Jayachandran 2003; Bramhachari and Dubey 2006; Bramhachari et al. 2007), de même que pour les *Pseudoalteromonas* (Holmström and Kjelleberg 1999; Rougeaux et al. 1999a; Saravanan and Jayachandran 2008; Liu et al. 2013). En revanche, aucune donnée concernant des espèces du genre *Ruegeria* produisant des EPS n'a été trouvée à ce jour.

Figure 21 : Arbre phylogénétique des souches productrices d'EPS établi à partir des séquences de la sous-unité ribosomique 16S d'environ 1400 pb.

Modèle de correction de Kimura appliqué à la technique du neighbour-joining (NJ) (500 réplifications), les bootstraps supérieurs à 75 ont été indiqués.

B. Les organismes producteurs de PHA

Concernant l'étude sur les PHA, 47 souches issues des tests de criblage par biologie moléculaire ont été séquencées (16S) pour une identification partielle et ont permis de mettre en avant la présence de 7 genres bactériens différents : *Photobacterium* (6), *Salinivibrio* (4), *Vibrio* (28), *Pseudoalteromonas* (5), *Pseudomonas* (1), *Ruegeria* (1), et *Marinomonas* (1). Sur l'ensemble des genres identifiés, une à deux espèces ont été sélectionnées sur la base de critères qui seront détaillés ultérieurement [Partie IV/I/A/1) et 2)] et des arbres phylogénétiques ont été générés selon le type de PHA étudié (Figure 22 et 23)



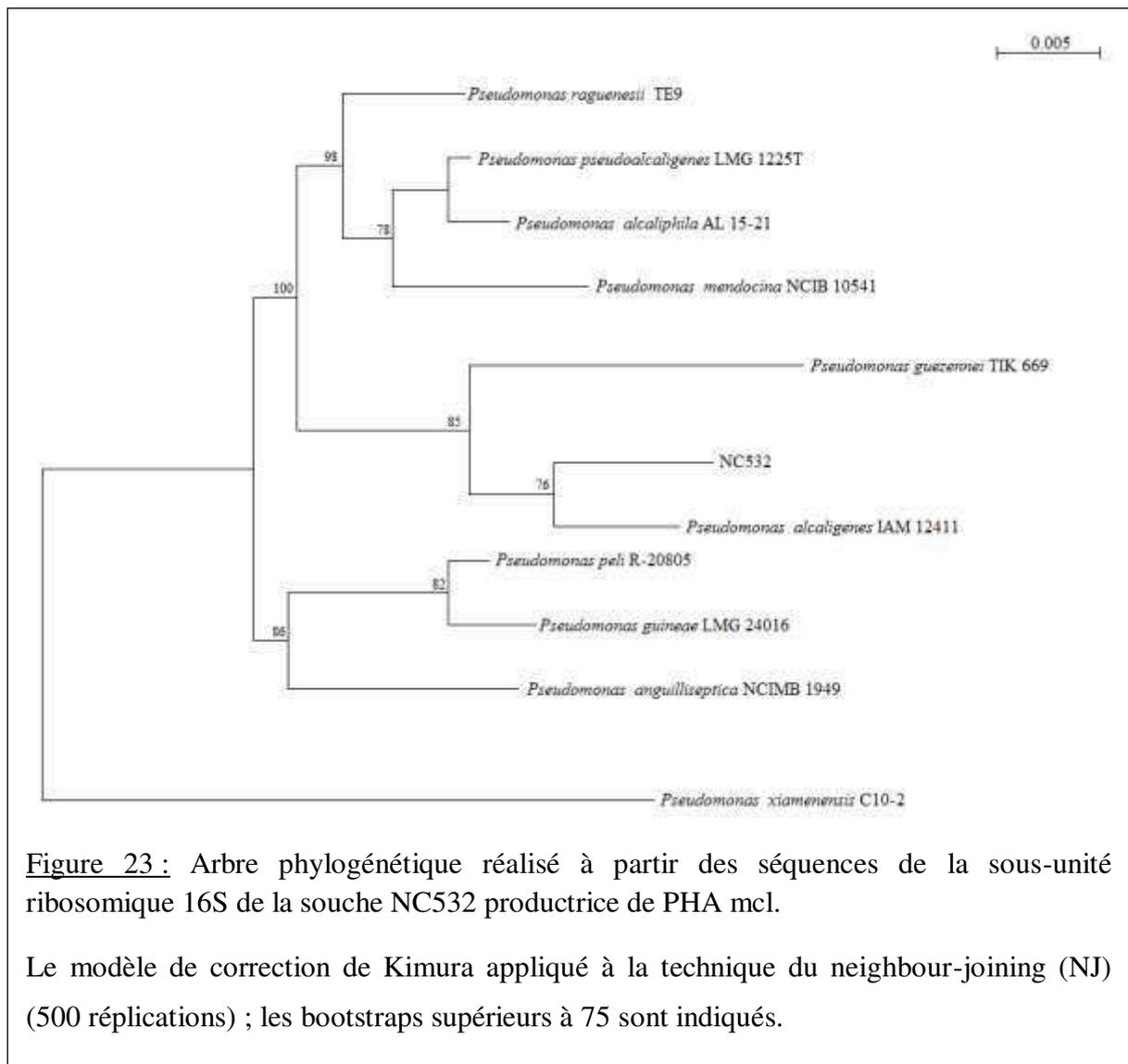


Figure 23 : Arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences de la sous-unité ribosomique 16S de la souche NC532 productrice de PHA mcl.

Le modèle de correction de Kimura appliqué à la technique du neighbour-joining (NJ) (500 réplifications) ; les bootstraps supérieurs à 75 sont indiqués.

Au regard de ces premiers résultats sur les bactéries productrices de PHA, nous pouvons conclure que le test de criblage PCR pour la détection des souches productrices de PHA scl a permis de mettre en évidence six genres bactériens tandis qu'une seule souche appartenant au genre *Pseudomonas* a été mise en évidence par le test de criblage PCR des PHA mcl.

En ce qui concerne les résultats sur la détermination du %G+C et du ΔT_m , seule la souche NC470 a fait l'objet de ce type d'étude, les résultats sont détaillés dans l'article [ci-dessous](#) (Chalkiadakis et al. 2013). On remarque ainsi que la technique du ΔT_m a montré des différences de température significatives (supérieur à 5°C) entre l'hybride formé à partir de la souche NC470 et les trois espèces types les plus proches. Le %G+C a été estimé pour une valeur de 45,98 ce qui correspond aux gammes existant chez les *Vibrio* (%G+C compris entre 40 et 50%) (Thompson et al. 2009). Trois hybrides ont été générés à partir d'un brin d'ADN de la souche NC470 couplé à un brin de *Vibrio natriegens*, *Vibrio alginolyticus* et *Vibrio diabolicus*, pour chacun d'entre eux le ΔT_m indique les données suivantes : 7,63°C; 5,68°C et 6,06°C respectivement. L'écart des T_m entre les hétéroduplexs et les homoduplexs indiquent donc que la limite inter-espèce de 5°C est dépassée et renforce l'argument selon lequel la souche NC470 devrait être considérée comme une nouvelle espèce du genre *Vibrio*.

Dans le cas des autres souches bactériennes étudiées, il serait à ce stade un peu précoce de discuter de la mise en évidence de nouvelles espèces, bien que l'étude des séquences 16S de certaines d'entre elles semble aller dans ce sens avec des pourcentages d'homologie inférieurs à 97% par rapport à des souches de référence. La souche NC282 (*Pseudoalteromonas*) présente un taux d'homologie estimé à 91% avec *Pseudoalteromonas rubra*. La souche NC615 (*Ruegeria*) présente un maximum d'homologie estimé à 95% avec *Ruegeria algalicola*. La souche NC532 (*Pseudomonas*) montre pour sa part 96% d'homologie avec la souche *Pseudomonas alcaligenes*. Des études plus poussées devraient donc être réalisées pour confirmer ces observations.

Parmi les *Vibrio*, seule la souche NC470 a été étudiée en détails et a rempli les critères pour être considérée comme un nouveau membre de ce genre. Le travail de phylogénie s'est focalisé en priorité sur les *Vibrio* car une grande partie des souches étudiés pour leur potentiel à produire des polymères se sont révélées appartenir à ce genre. Le genre *Vibrio* est relativement complexe à étudier de par l'étroite limite inter-espèce qu'il succite et nécessite de multiplier les techniques d'études avant de pouvoir confirmer l'identification d'une espèce. L'exemple le plus marquant est celui de *Vibrio cholerae* (responsable du choléra) et *Vibrio mimicus* (non pathogène) qui partagent un taux d'homologie 16S proche de 100% et une

homologie proche de 80% lors de l'hybridation ADN/ADN. C'est l'étude des gènes de ménage qui a permis de dissocier génétiquement ces deux espèces (Thompson et al. 2008). Ainsi les études sur les gènes de ménage (MLST) et les tests de caractérisation moléculaire (% G+C, ΔT_m) sont des techniques recommandées pour la dissociation des espèces du genre *Vibrio*.

Nous sommes conscients que des analyses plus poussées devraient être faites pour satisfaire pleinement les critères de caractérisation phylogénétique avec notamment des analyses sur la composition lipidique ou encore des études comparatives (tests biochimiques). Cependant il est important de rappeler que le principal objectif de cette étude porte sur le potentiel de production des biopolymères bactérien. L'identification des bactéries marines nous fournit des éléments important dans le cadre d'une perspective d'étude chimiotaxonomique. Ceci est particulièrement vrai dans le cas des *Vibrio* qui représentent le genre majoritairement présent dans nos tests de criblage et, comme nous allons le voir ultérieurement, présentent des similitudes quant à la composition osidique de leurs EPS. Les études génétiques et phylogénétiques nous ont également permis de développer et de valider un test de criblage pour les PHA ainsi que de montrer l'efficacité de ce test sur une large gamme de bactéries. Une fois de plus la famille des Vibrionaceae (*Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*) est largement représentée.

La forte présence des Vibrionaceae dans la collection peut être en partie expliquée par le choix des zones prospectées ainsi que le milieu de culture utilisé pour les isollements bactériens. Les Vibrionaceae sont connus pour être une famille de bactéries aquatiques colonisant des milieux intertidaux, sédiments, récifs de corail, estuaires avec une prédilection pour les zones à forte densité en organismes marins (Thompson et al. 2004). Les eaux calédoniennes semblent donc être un terrain propice à la présence des Vibrionaceae ; ceci se reflète notamment par leur impact sur l'économie locale dans le secteur de l'aquaculture (Costa et al. 1998; Goarant et al. 2006). D'autre part, les *Vibrio* sont des bactéries mésophiles peu exigeantes en matière de conditions de culture en laboratoire, et se développent facilement sur milieu Zobell et dans les conditions choisies (température, pH, salinité). Le choix de ce milieu a très probablement eu une forte influence sur la sélectivité des espèces isolées et explique en partie, au regard des premiers résultats d'identification, la faible

diversité de micro-organismes de la collection. Le milieu Zobell est très couramment utilisé pour l'isolement des bactéries marines, et aussi pour la production à grande échelle de biopolymères bactériens. Il nécessite peu de préparation, est bon marché et rassemble des conditions de culture peu contraignantes.

C. Description et caractérisation partielle d'un exopolysaccharide produit par une bactérie marine, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov, de Nouvelle-Calédonie.

L'article suivant a été publié dans la revue *Journal of Applied Microbiology* et fait état des outils et des protocoles utilisés pour décrire une nouvelle souche bactérienne appartenant au genre *Vibrio*. Cette souche a suscité un intérêt de par sa faculté à produire une grande quantité d'EPS présentant une composition chimique originale.

Partie III : Étude de quelques EPS produits
par les Bactéries de Nouvelle-Calédonie

I. Matériel et méthodes

A. Le criblage des souches

En premier lieu, un criblage a été réalisé au sein de la collection d'isolats de Nouvelle-Calédonie afin de sélectionner les souches potentiellement intéressantes pour la production d'EPS.

Ce criblage est basé sur l'observation phénotypique des colonies sur milieu gélosé Zobell en comparaison avec un milieu gélosé Zobell enrichi en glucose. Les EPS étant des substances extracellulaires, le grossissement et/ou le développement d'un aspect muqueux des colonies sur un milieu enrichi en glucose est indicatrice d'une potentielle production d'EPS. Cependant, ce test phénotypique ne suffit pas pour affirmer la synthèse d'EPS, d'autres substances extracellulaires pouvant être produites (glycolipides...). Des cultures en milieu liquide devront être réalisées pour confirmer/infirmier cette hypothèse.

Les souches issues de la collection sont étalées sur boîtes de culture, simultanément sur les deux milieux cités précédemment, puis la croissance des colonies est comparée au terme de 2 jours d'incubation à 30°C. En fonction du degré de variation du phénotype, notamment du développement plus ou important de la colonie et d'un aspect muqueux, les isolats ont été classés selon une note allant de 1 (les moins réactives) à 3 (les plus réactives) ([Figure 24](#)).

À l'issue de ce criblage, plus de la moitié des isolats de la collection NC a réagi positivement avec un développement plus ou moins marqué des colonies, associé à un aspect muqueux ([Tableau 12](#)).

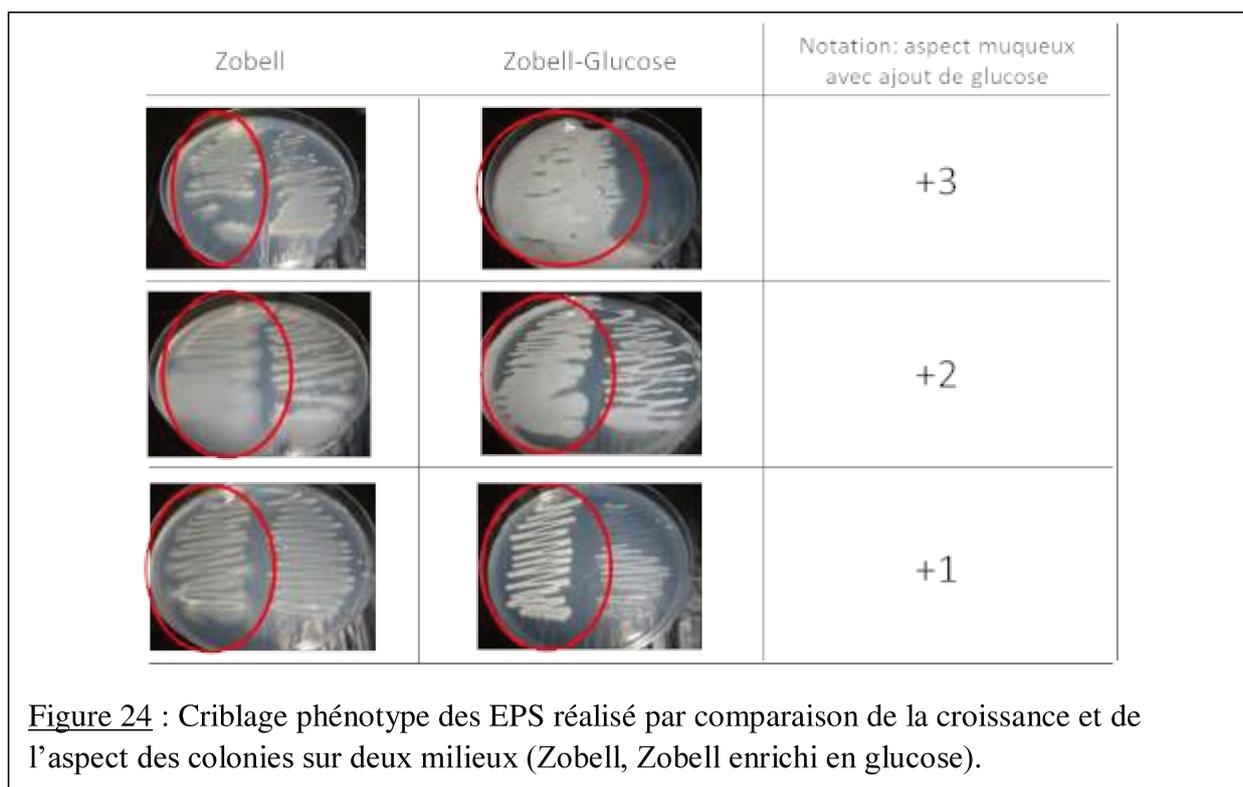


Tableau 12 : Résultats du criblage phénotypique réalisé pour la recherche de bactéries potentiellement productrices d'EPS.

Campagne 2010					Campagne 2011				
Sites	Note criblage			Total	Sites	Note criblage			Total
	1	2	3			1	2	3	
Site I	16	10	0	26	Site I	13	8	1	22
Site II	6	8	4	18	Site II	15	6	5	26
Site III	28	10	0	38	Site III	11	4	3	18
Site IV	2	5	1	8	Site IV	21	12	5	38
Site V	19	21	2	42	Site V	11	7	4	22
Site VI	1	2	0	3	Site VI	8	3	0	11
Site VII	6	11	3	20	Total	79	40	18	137
Site VIII	2	4	0	6	%	29,3	14,8	6,7	50,7
Site IX	2	3	0	5					
Site X	20	17	6	43					
Site XI	28	23	7	58					
Site XII	10	6	1	17					
Site XIII	0	1	1	2					
Total	140	121	25	286					
%	28,4	24,5	5,1	58,0					

B. La production des EPS

1) Culture en bioréacteur

À l'échelle du laboratoire, la production des EPS est réalisée en fermenteur de 5L, en milieu Zobell (30 g.L⁻¹ de sels de mer, 1 g.L⁻¹ d'extrait de levure et 5 g.L⁻¹ de peptone) supplémenté en glucose (30 g.L⁻¹). Le milieu est inoculé (10%) par une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance. La température appliquée est, de quelques degrés, inférieure à la température optimale de croissance afin de favoriser la production d'EPS. Le pH est maintenu au pH optimum par addition de soude (NaOH 2N) ou d'acide (H₂SO₄ 2N). Le milieu est oxygéné à 30 L.h⁻¹ sous une agitation de 200 à 1100 tours.min⁻¹ selon l'oxygénation. Un suivi de la croissance bactérienne est réalisé par mesure de la densité optique (DO) à 520nm. La consommation du glucose peut également être suivie afin d'ajuster l'apport en glucose nécessaire pour la synthèse des EPS.

La fermentation est arrêtée après 48h à 72h, l'ajout d'azoture de sodium à 0.4g.L⁻¹ permet alors stopper toute croissance.

2) Extraction, purification et conditionnement des EPS

Après ces 2 à 3 jours de fermentation, les exopolysaccharides sont extraits du milieu de culture. On procède tout d'abord à une centrifugation (15 000 g, 2 fois 45 minutes) afin d'éliminer les cellules bactériennes. Le surnageant contenant l'EPS est ensuite purifié par ultrafiltration (100 kDa). Cette étape consiste à éliminer les petites molécules d'un échantillon par passage à travers une membrane de seuil de coupure donné. De l'eau est ajoutée afin d'augmenter l'efficacité de l'ultrafiltration en permettant un passage en continu sur la membrane. L'élimination des sels est suivie par conductimétrie. Enfin l'échantillon sera concentré, congelé, puis lyophilisé et stocké à l'abri de l'humidité.

C. Caractérisation chimique des EPS

Les analyses chimiques des EPS peuvent s'avérer très complexes et sont décomposées en deux phases, une première série d'analyses permettant une description globale du polymère, puis dans une seconde phase, une analyse détaillée pouvant aller jusqu'à l'identification de l'unité répétitive.

Dans le cas présent, le nombre conséquent des EPS produits ne permettait pas d'envisager une étude structurale complète sur chacun d'entre eux, et seule une analyse globale (parfois complétée d'expérimentations complémentaires, par RMN et HPSEC) a été menée sur les EPS jugés les plus intéressants en terme de rendement de production.

1) Dosages colorimétriques

L'ensemble des dosages colorimétriques a été réalisé en triplicatas.

a. Dosage des protéines

Ce test colorimétrique repose sur la réaction en milieu alcalin des protéines avec les ions cuivriques Cu^{2+} qui seront réduits en ions cuivreux Cu^+ formant ainsi un complexe avec l'acide bicinchoninique (BCA) pour donner une coloration pourpre mesurable à 562 nm.

La méthode utilisée pour le dosage des protéines est issue des études de Lowry (Lowry et al. 1951), Smith (Smith et al. 1985) et Brown (Brown et al. 1989) :

- Liste des réactifs :

- Une solution BCA.
- Une solution 4%(w/v) de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
- Solution standard de protéine BSA $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (pour la gamme étalon).

Le réactif est préparé de façon extemporanée en ajoutant 50 mL de réactif BCA (1 mg mL⁻¹ final) et 1 mL réactif CuSO₄ (4% m/v). À 100 µL de l'échantillon à doser sont ajoutés 2 mL de réactifs dans un tube en verre brûlé. Le mélange est vortexé et placé 30 minutes dans un bain-marie à 37°C. Il est ensuite refroidi sous l'eau courante. L'absorbance de chacune des solutions est mesurée à 562 nm. L'étalonnage est réalisé en faisant une gamme de 0 à 0,5 mg.mL⁻¹ de BSA. Les mesures sont réalisées sur trois concentrations d'échantillons (0,5 ; 1 et 2 g.L⁻¹ d'EPS préparé dans de l'eau).

b. Dosage des oses neutres

La méthode de dosage des oses neutres par le réactif au phénol/sulfurique développée par Dubois (DuBois et al. 1956), complétée par le protocole de Chaplin (Chaplin 1986) est rapide, facile à mettre en œuvre, sensible et reproductible. Cette réaction colorimétrique n'est toutefois pas spécifique, en effet des réactions sont possibles avec les aldoses, les cétooses et les acides uroniques qui rendent également une coloration. En raison de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres, il est nécessaire de corriger les calculs par la méthode établie par Montreuil et Spik (Montreuil J and Spik G 1963).

L'ajout d'acide sulfurique provoque une hydrolyse des liaisons osidiques et permet d'obtenir des monomères libres et déshydratés qui vont ensuite réagir avec une solution de phénol pour donner une coloration bleutée mesurable à 490 nm.

L'ensemble des échantillons et des standards sont traités comme suit : 200 µL de la solution d'EPS à doser (à 0,2 ; 0,4 ; 0,8 mg.mL⁻¹) sont introduits dans des tubes en verre. 200 µL d'une solution de phénol 5%, ainsi que 1 mL d'acide sulfurique à 97 % (v/v), les tubes sont laissés au repos pendant 10 minutes avant d'être agités. L'absorbance de chaque solution est lue à 510 nm au bout de 30 minutes. Deux gammes étalon sont réalisées avec des solutions contenant de 25 à 200 µg de glucose ou d'acide glucuronique sont traitées dans les mêmes conditions.

c. Dosage des acides uroniques

La quantité d'acides uroniques est déterminée par le dosage mis au point par Blumenkrantz et Asboe-Hansen (Blumenkrantz and Asboe-Hansen 1973) modifié par Filisetti-Cozzi et Carpita (Filisetti-Cozzi and Carpita 1991). Ce dosage emploie le métahydroxydiphényl (MHDP). Comme pour le dosage des oses neutres, l'acide sulfurique concentré provoque l'hydrolyse des chaînes polysaccharidiques et permet la formation de dérivés furfural. Les acides uroniques réagissent avec le 3-hydroxydiphényl pour donner une coloration rose accentuée en présence de borate et détectée par lecture de l'absorbance à 525 nm. La réaction colorimétrique est sensible aux interférences dues aux sucres neutres qui brunissent en présence d'acide sulfurique. Cette interférence est minimisée par traitement de l'échantillon avec du sulfamate avant l'hydrolyse acide. Comme dans le cas précédent deux gammes étalons sont réalisées (une gamme d'oses neutres (Glucose) et une gamme d'acide uronique (acide glucuronique)).

Pour se faire, 50, 100 et 200 μL de la solution d'EPS à doser (à $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sont introduits dans des tubes en verre. Le volume est complété à 400 μL par de l'eau milli-Q. 40 μL d'une solution de sulfamate (acide sulfamique/potassium sulfamate 4 M pH 1,6) ainsi que 2.4 mL d'une solution de tétraborate de sodium à 75 mM préparée dans l'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Après 20 minutes au bain-marie à 80°C , les tubes sont placés dans de la glace et 80 μL d'une solution de MHDP (0.15 % p/v) sont ajoutés. Après agitation, les tubes sont laissés à température ambiante pendant 20 minutes et l'absorbance est lue à 525 nm. L'étalonnage est effectué dans les mêmes conditions à l'aide de deux gammes de 25 à 200 μg d'acide glucuronique ou de glucose.

Les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques des solutions polysaccharidiques sont obtenues en utilisant une méthode de calcul qui permet d'appliquer des facteurs de correction pour minimiser les interférences des acides uroniques dans le dosage des oses neutres (Montreuil J and Spik G 1963).

L'analyse UV-visible des solutions témoins d'oses neutres (Glucose) et d'acides uroniques (Acide glucuronique) permet de tracer les droites d'étalonnages du dosage. La pente de chaque droite étalon est mesurée :

Dosage des oses neutre : Pente = α pour le Glucose

Pente = β pour l'Acide glucuronique

Dosage des acides uroniques : Pente = α' pour le Glucose

Pente = β' pour l'Acide glucuronique

À partir de ces pentes et en fonction des densités optiques (D.O) mesurées lors des dosages, les concentrations en acides uroniques (AU) et en oses neutres (ON) sont déterminées grâce aux expressions suivantes :

$$\text{DO test Dubois} = \alpha [\text{ON}] + \beta [\text{AU}]$$

$$\text{DO acides uroniques} = \alpha' [\text{ON}] + \beta' [\text{AU}]$$

On en déduit alors les concentrations suivantes :

$$[\text{Oses Neutres}] = (\text{DO test Dubois} - \beta [\text{AU}]) / \alpha$$

$$[\text{Acide Uronique}] = \alpha [(\text{DO acides uroniques} - \alpha' \text{DO test Dubois}) / (\alpha\beta' - \alpha'\beta)]$$

d. Dosage des osamines et N-acétyl-osamines

Les osamines et N-acétyl-osamines sont dosées sans distinction sous forme d'osamines libres après hydrolyse. Cette méthode implique la condensation des osamines libres avec l'acétylacétone, qui conduit à la formation de dérivés de pyrrole. Ces derniers développent une coloration rose en présence de paradiméthylaminobenzaldéhyde (réactif d'Ehrlich). Les mesures d'absorbance sont réalisées à 520nm (Belcher et al. 1954).

L'hydrolyse de l'échantillon (1 et 0,5 mg.mL⁻¹) est réalisée par 1 mL d'HCl 8N à 100°C pendant 1h, suivie d'une neutralisation par ajout de 1.7 mL NaOH 4N. Le dosage des

osamines et N-acétyl-osamines est ensuite réalisé sur 500 µL d'hydrolysate neutralisé, par ajout de 500 µL d'acétylacétone et 1 mL d'eau distillée. Les tubes sont placés 1h au bain-marie à 100°C, puis refroidi dans un bain de glace. On ajoute 2,5 mL d'éthanol absolu, le mélange est agité et placé au bain-marie à 75°C pendant 5 minutes. Puis, 500 µL de réactif d'Ehrlich sont ajoutés, et le mélange est maintenu à 75°C pendant 30 minutes. Les échantillons sont à nouveau refroidis et 2,5 mL d'éthanol absolu sont ajoutés. Les tubes sont agités et placés pendant 30 minutes à l'obscurité avant lecture de l'absorbance à 520 nm.

L'étalonnage est effectué dans les mêmes conditions à l'aide d'une solution de N-acétyl-glucosamine.

2) Détermination de la composition osidique par chromatographie phase gazeuse

La détermination et le dosage des monosaccharides constitutifs des EPS ont été effectués selon la méthode de Kamerling (Kamerling et al. 1975) modifiée par Montreuil (Montreuil et al. 1986). Cette méthode nécessite la séparation par méthanolyse des différents résidus du polymère, de façon à n'obtenir que des monomères. Les résidus glycosidiques sont ensuite triméthylsilylés afin de les rendre plus volatiles, et injectables en chromatographie en phase gazeuse.

La méthanolyse est réalisée dans un tube en verre Pyrex, contenant 400 µg de polysaccharide et 20 µg de myo-inositol (utilisé comme étalon interne), par ajout 500 µL d'un mélange méthanol/acide chlorhydrique 3 N (Supelco) pendant 4 h à 100°C. Après refroidissement à température ambiante, le méthanolysate est neutralisé à l'aide de carbonate d'argent puis 50 µL d'anhydride acétique sont ajoutés afin de réacétyler les osamines éventuellement présentes. Après une nuit à l'obscurité et à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 3000 rpm et le surnageant est évaporé sous jet d'azote. Les méthylglycosides sont triméthylsilylés dans 50 µL de pyridine par l'ajout de 50 µL de sylon (BSTFA : TMCS, 99:1, Supelco), et incubation 2h30 à température ambiante. Après évaporation douce des réactifs en

excès sous jet d'azote, les glycosides de méthyle triméthylsilylés sont repris dans 500 μL de dichlorométhane puis injectés en chromatographie en phase gazeuse sur le système Agilent 6990 utilisant une colonne CP-SIL 5CB (60 m, 0,32 mm de diamètre interne), l'hélium comme gaz vecteur et le programme de montée en température suivant : 50°C maintenus pendant 1 minute, puis un gradient de 20°C min^{-1} jusqu'à 120°C, suivi d'un gradient de 2°C min^{-1} jusqu'à 250°C et d'un palier de 5 minutes à 250°C.

Chaque monosaccharide a été identifié par comparaison des temps de rétention avec des standards en tenant compte de l'étalon interne. Un coefficient de réponse a été calculé pour chaque monosaccharide par rapport à la quantité de l'étalon interne afin de définir la proportion de chaque monosaccharide au sein du polysaccharide.

3) La chromatographie d'exclusion stérique

La masse moléculaire des EPS est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique haute pression (HPSEC). Ces analyses ont été effectuées au sein de l'UMR 6120 PCI au Mans sur un système composé d'une colonne HF gel PW 6000, élué par H₂O, NaNO₃ 0.1M à un débit de 1 mL. min^{-1} . La détection est effectuée par couplage réfractométrie et détection UV à 280nm. Les grains formant la colonne vont d'autant plus retenir les molécules que celles-ci seront de faible poids moléculaire. Ainsi les fractions polymériques de plus fort poids moléculaire seront éluées en premier. La courbe d'étalonnage se fait à partir d'une solution de pectine.

Dans le cadre de cette étude doctorale, deux EPS ont été analysés, l'échantillon NC336 et le NC470.

4) Analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La RMN est une technique non destructive qui permet d'obtenir des informations quant à la structure des EPS.

Entre 10 et 20 mg d'EPS sont dissous dans 1 mL d'eau deutérée (D₂O) à 99,98%. L'échantillon est alors lyophilisé puis repris à nouveau dans du D₂O. Cette opération qui permet d'éliminer un maximum d'H₂O captée au sein de l'EPS est répétée au minimum deux fois.

Ces études par RMN ont été réalisées au Laboratoire de Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université de Bretagne Occidentale sur un spectromètre Bruker DRX 500 MHz équipé d'une sonde 5mm TBI 1H/(BB) 13C, à 25 °C et 50°C. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à la référence interne TSP (acide triméthylsilylpropionique).

5) Analyse par Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les analyses IRTF sont réalisées directement sur les échantillons d'EPS lyophilisés, à l'aide du spectromètre Nicolet iS10 ThermoScientific en détection ATR. Pour cela l'échantillon est déposé sur un disque de germanium, puis analysé avec un balayage de longueurs d'onde allant de 4000 cm⁻¹ à 600 cm⁻¹ (64 scans).

II. Résultats et Discussion

A. Caractérisation chimique globale

1) La colorimétrie

La composition globale des EPS produits par 10 souches bactériennes ayant répondu très positivement (note = 3) au test de criblage phénotypique a été déterminée grâce aux dosages colorimétriques. Ces analyses donnent une première estimation de la teneur en résidus osidiques (oses neutres, osamines, acides uroniques) et de la pureté de l'échantillon (dosage des protéines). Les résultats obtenus sur la composition et les rendements de production sont présentés dans le [Tableau 13](#).

Tableau 13 : Composition globale des EPS par souche (% massique), et rendements de production (g.L⁻¹).

Sur les dix échantillons analysés, huit (NC275, NC336, NC359, NC456, NC470, NC490, NC493, NC615) d'entre eux se révèlent être composés d'un taux élevé d'hexosamines, compris entre 22 et 56%. L'analyse a également mis en évidence cinq échantillons (NC 336,

NC359, NC393, NC456, NC470) contenant des proportions intéressantes d'acides uroniques comprises entre 10 et 64%. Le dosage des oses neutres a révélé que quatre échantillons (NC282, NC393, NC456, NC615) contiennent des proportions importantes de ces composés avec des valeurs s'échelonnant de 35 à 80%. Dans ce dernier cas, on remarque que l'échantillon NC282 semble être exclusivement composé d'oses neutres (plus de 80%), cette observation devra être confirmée par des tests complémentaires (IRFT, CPG).

Les dosages des teneurs en protéines n'excèdent pas 5%, cette information démontre l'efficacité du système de purification par ultrafiltration tangentielle.

Les rendements obtenus pour la production des différents EPS sont également indiqués dans le tableau et sont compris entre 2 et 5 g.L⁻¹. À noter que ces productions ont été réalisées sans chercher, pour le moment, à optimiser les paramètres optimaux pour la synthèse des EPS chez les différentes bactéries.

2) L'analyse par Spectrométrie Infrarouge à transformée de Fourier

Les résultats des dosages chimiques ont été complétés par l'analyse des EPS natifs par IRTF, une méthode d'analyse rapide permettant de détecter les bandes caractéristiques des groupements constitutifs de l'EPS. Ainsi, les principales bandes retrouvées chez les EPS sont :

- Une bande très large entre 3000 et 3600 cm⁻¹ qui résulte de l'absorption des vibrations d'élongation des liaisons hydroxyles (O-H) se trouvant dans le polymère ainsi que dans l'eau résiduelle.
- Une bande intense centrée à 1050 cm⁻¹, région attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons C-O et C-O-H.
- Une bande vers 2940 cm⁻¹ caractéristique de l'absorption des vibrations d'élongation des liaisons C-H.

- La présence d'une bande à 1600 cm^{-1} , qui peut être due à plusieurs types de liaisons C=O pouvant être contenues dans les acides uroniques ou dans les substituants.
- Une bande à 1730 cm^{-1} caractéristique des vibrations d'élongation des liaisons carboxyles que l'on peut attribuer à la présence d'ester (substituant organique) présent dans le polymère.
- Deux bandes vers 1550 et 1630 cm^{-1} correspondant respectivement aux groupements amines I et amines II, pouvant indiquer la présence de protéines ou d'osamines.
- Un doublet situé à 1250 cm^{-1} et 1230 cm^{-1} caractéristique d'esters de sulfates peut être présent chez certains EPS.

Les spectres FTIR des échantillons d'EPS produits par les souches NC275, NC282, NC359 et NC393 sont présentés en [Figure 25](#).

Dans tous les cas, on note l'absence de bandes à 1230 et 1250 cm^{-1} indiquant que les EPS analysés ne sont pas sulfatés.

(a)

(b)

Figure 25 : Spectres IRTF obtenus pour les échantillons d'EPS NC275 (a), NC282(b), NC359 (c) et NC393 (d).

(c)

(d)

Figure 25 : Spectres IRTF obtenus pour les échantillons d'EPS NC275 (a), NC282(b), NC359 (c) et NC393 (d).

L'analyse IRFT est cohérente avec les dosages colorimétriques. Le spectre IRTF de l'échantillon NC275, dont le taux d'hexosamines a été estimé à près de 41%, affiche effectivement deux bandes à 1548 et 1634 cm^{-1} correspondants aux groupements amines I et amines II. La faible proportion de protéines, estimée à 3,02% renforce cet argument.

Le spectre IRTF de l'EPS NC282 confirme également l'absence de certains groupements chimiques tels que les hexosamines, protéines et acides uroniques. On observe par contre une bande très large entre 3000 et 3600 cm^{-1} correspondant aux liaisons hydroxyles (O-H) ainsi qu'une bande à 1021 cm^{-1} caractéristique des liaisons C-O et C-O-H. L'échantillon NC282 étant essentiellement composé d'oses neutres, le spectre IRTF va également dans ce sens.

L'échantillon NC359 s'est révélé contenir une part importante d'hexosamines (21,69%) et d'acides uroniques (64,37%) ce qui se traduit sur le spectre IRFT par la présence d'une bande intense entre 1550 et 1630 cm^{-1} qui a tendance à décrire un doublet, probablement dû à un chevauchement des pics des acides uroniques (liaison C=O à 1600 cm^{-1}) et ceux des groupements amine I et amine II (1550 et 1630 cm^{-1}).

Quant à l'échantillon NC393, pour lequel un taux élevé en acides uroniques a été déterminé par dosages colorimétriques, son spectre IRTF présente un pic intense à 1594 cm^{-1} caractéristique des liaisons C=O.

B. Caractérisation des EPS

1) Composition glycosidique par chromatographie phase gazeuse

La nature des résidus glycosidiques des dix EPS produits a été déterminée par CPG, l'identification a été réalisée par comparaison des temps de rétention d'un mix de standard (Figure 26) et les résultats sont rassemblés dans le Tableau 14. Le résidu glucose est retrouvé chez tous les EPS, excepté au sein des échantillons NC359 et NC493 composés uniquement d'osamines et d'acides uroniques. À l'inverse, NC393 ne contient pas d'osamine, mais uniquement des oses neutres (Glu, Gal, Man, Fuc) et de l'acide glucuronique. Se dégagent ensuite les échantillons NC275, NC336, NC456 et NC470 tous composés d'oses neutres, acides uroniques et osamines, présents en proportions différentes.

Tableau 14 : Composition glycosidique des EPS déterminée par CPG.

Figure 26 : Chromatogramme CPG des dérivés méthylglycosides O-triméthylsilylés de composés standards.

On note que le taux de recouvrement total (somme massique %) des échantillons n'excède que rarement 40%, ceci est pour partie expliqué par le procédé d'hydrolyse. Cependant, une somme massique faible laisse également préjuger d'une faible teneur en sucres au sein du polymère ; pouvant alors s'agir de glycolipides ou glycoprotéines. Ainsi, les polymères pour

lesquels la composition glycosidique est inférieure à 30% de la masse initiale n'ont pas été conservés dans la suite de l'étude.

En nous basant sur les résultats des rendements de production, la composition glycosidique et le taux de recouvrement en masse, nous nous sommes ensuite davantage intéressés aux EPS NC336 et NC470, dont les structures et rendements de production nous paraissaient intéressants. Des expérimentations complémentaires ont été menées, notamment par RMN et HPSEC.

2) Masse moléculaire des EPS NC336 et NC470

Le profil d'éluion de l'EPS NC336 (Figure 27) en chromatographie d'exclusion stérique met en évidence un pic majeur de masse moléculaire élevée, estimée à 6 845 580 Da, et un indice de polydispersité équivalent à 1,608. La présence d'un second pic semble indiquer une deuxième population de masse plus faible.

Figure 27 : Chromatogramme d'exclusion stérique de l'EPS NC336.

Concernant l'EPS NC470, sa masse moléculaire a été estimée à 672 000 Da avec un indice de polydispersité de 1,7. L'ensemble des résultats concernant la caractérisation chimique de l'EPS NC470 et la description taxonomique de la souche bactérienne a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Applied Microbiology* (Chalkiadakis et al. 2013).

3) Résonance Magnétique Nucléaire

En raison d'une viscosité et d'une structure complexe, les spectres RMN ^1H et ^{13}C des EPS natifs offrent une résolution souvent très moyenne, et ne sont pas toujours exploitables, nécessitant alors une procédure de dépolymérisation souvent fastidieuse et destructrice.

Dans le cas de cette étude, nous avons procédé aux analyses par RMN ^1H uniquement sur les EPS natifs NC336 et NC470 afin de compléter les données structurales issues de l'analyse globale et de l'analyse des résidus glycosidiques.

Le spectre ^1H de l'EPS NC336 en [Figure 28](#) montre plusieurs signaux pouvant être identifiés et donnant des premières informations sur la structure du polymère :

- on distingue 4 à 5 protons anomériques dans la région entre 4 et 5 ppm, mettant en évidence la présence d'au moins 4 à 5 résidus glycosidiques. Les signaux des protons 2 à 5 des cycles se trouvent dans la région comprise entre 3 à 4,8 ppm.
- Le signal à 1,4 ppm correspond à un groupement méthyle pouvant appartenir à un 6-désoxy sucre ou un substituant acétate ou pyruvate.
- Le signal à 1,97 ppm peut être attribué au groupement N-acétylé.

Figure 28 : Spectre RMN ^1H de l'échantillon d'EPS produit par la souche NC336.

Les données chimiques recueillies sur quelques EPS produits par des souches de Nouvelle-Calédonie constituent des pistes de valorisation pour ces biopolymères. En lien avec l'étude taxonomique associée à la description de plusieurs bactéries, nous avons cherché à établir une corrélation entre la composition de l'EPS et l'appartenance phylogénétique de la souche productrice.

Nous avons constaté que la plupart des souches néo-calédoniennes appartenant au genre *Vibrio* produisent des EPS contenant une part importante d'acides uroniques et d'hexosamines. D'après les données de la littérature, peu de bactéries semblent produire des EPS riches en hexosamines, excepté les membres de ce genre. Le cas de la souche *Vibrio diabolicus* HE800 isolée au niveau d'une source hydrothermale profonde et produisant un EPS linéaire composé d'acides uroniques et d'hexosamines (50/50) (Rougeaux et al. 1999) a été rapporté. De nombreux autres travaux attestent de la présence de ces composés chez les *Vibrio* (Reddy et al. 1992; Rougeaux et al. 1996; Rougeaux et al. 1999b; Enos-Berlage and McCarter 2000; Muralidharan and Jayachandran 2003; Bramhachari and Dubey 2006; Bramhachari et al. 2007; Kavita et al. 2011; Kim et al. 2011). On retrouve très peu d'exception dans la littérature, la seule répertoriée est celle issue des travaux de Muralidharan et Jayachandran (Muralidharan and Jayachandran 2003) qui décrivent la présence d'aminoarabinose et aminoribose comme principaux constituant de l'EPS produit par *Vibrio alginolyticus*.

La présence d'acides uroniques et d'hexosamines en proportions importantes ouvre des pistes de valorisation pour ces EPS dont la structure se rapproche de celle des glycosaminoglycanes (GAG), en particulier de l'acide hyaluronique (HA). L'acide hyaluronique est utilisé dans des secteurs à haute valeur ajoutée, notamment dans le domaine médical en chirurgie ophtalmique (transplantation de cornée) et réparatrice (traitement des grands brûlés) (Ascher et al. 2004; Garg and Hales 2004; Gao et al. 2008; Higashide and Sugiyama 2008). Il trouve également des applications en cosmétique en tant qu'agent hydratant, antirides ou cicatrisant (Averbeck et al. 2006; Kogan et al. 2007). Certains produits de fermentation bactérienne dont la structure est proche du HA sont déjà commercialisés, c'est le cas du Juvéderm®, EPS produit par *Streptococcus equus* utilisé comme antiride (Coleman and Patrick 2012). Des produits tels que le Restylane® ou le Belotero® sont également élaborés à partir d'un polymère issu d'une bactérie du genre *Streptococcus* et utilisés en chirurgie esthétique (Manna et al. 1999).

Aujourd'hui, la valeur marchande des HA est estimée entre 750-1500 €/kg et ce marché connaît une croissance annuelle de 15% depuis 1997 (Chong et al. 2005).

Concernant le genre *Pseudoalteromonas*, représenté dans notre étude par la souche NC282, les données bibliographiques décrivent des EPS constitués essentiellement d'oses neutres, c'est le cas de l'EPS NC282 composé uniquement de résidus de glucose. À titre d'exemple, la souche HYD721 qui est une *Pseudoalteromonas* isolée au niveau d'une source hydrothermale profonde synthétise un EPS majoritairement composé d'oses neutres (57%) et d'acides uroniques (11%) (Rougeaux et al. 1996; Rougeaux et al. 1999a). D'autres études portant sur les EPS des souches du genre *Pseudoalteromonas* de milieux polaires ont montré une composition osidique majoritairement constituée d'oses neutres (Kim and Yim 2007; Qin et al. 2007; Saravanan and Jayachandran 2008; Liu et al. 2013) avec dans certains cas la présence d'acides uroniques (Holmström and Kjelleberg 1999; Mancuso Nichols et al. 2004; Nichols et al. 2005a). D'autre part, dans ces différents travaux montrent que la composition osidique des EPS présents chez certaines *Pseudoalteromonas* a été mise en relation avec la nature de l'environnement. Il a notamment été observé une contribution plus marquée des acides uroniques au sein des EPS produits par certaines souches vivant dans des environnements pauvres en sels métalliques, les groupements uroniques pouvant jouer un rôle dans la captation des métaux.

La capacité des EPS à chélater les métaux constitue une piste de valorisation extrêmement intéressante dans de nombreux secteurs industriels. En Nouvelle-Calédonie, la principale activité économique est liée à l'exploitation des mines de nickel qui engendre une pollution environnementale par des résidus chargés en métaux lourds. Ainsi la possibilité de limiter cette pollution par l'utilisation de biopolymères bactériens représente une voie de recherche privilégiée. Cet aspect sur la chélation des métaux a été abordé dans une étude préliminaire qui fait l'objet du paragraphe suivant.

III. Détermination de la capacité de chélation des métaux lourds par quelques EPS produits par des bactéries de Nouvelle-Calédonie. Etude Préliminaire.

Considérant les structures chimiques des EPS et notamment la présence de fonctions chélatrices (carboxyles, hydroxyles, amines, sulfates...), ces biopolymères peuvent présenter un fort intérêt dans différents secteurs industriels dont l'agroalimentaire, la cosmétique et la gestion de l'environnement. Sur ce dernier créneau, ils peuvent constituer une alternative à l'utilisation d'autres approches chimiques ou physico-chimiques certes efficaces, mais souvent onéreuses et sans réelle spécificité quant aux ions métalliques ciblés. Cette forme de biocaptation est abordée depuis les années 80 et fait l'objet d'un intérêt grandissant de la part des industriels (Brown and Lester 1979; Diels et al. 1995; Volesky and Holan 1995; Ledin and Pedersen 1996; Matis et al. 1996; Kratochvil and Volesky 1998; Diels et al. 1999).

La chélation des métaux implique certains mécanismes tels que l'interaction de surface par échange d'ions, considérée comme le mécanisme prédominant (Fourest and Volesky 1997) ou encore l'attraction électrostatique avec certains groupements spécifiques tels que les acides carboxyliques, les groupements sulfate ou les phosphates (Crist et al. 1994). La présence de groupements chargés au sein des EPS pourrait donc favoriser la rétention des métaux. Cependant, elle ne garantit pas l'accessibilité des sites de biosorption également dépendante d'autres paramètres comme la conformation et l'encombrement stérique. De nombreuses études ont déjà été menées sur les EPS, notamment au sein du LBMM (Loaëc et al. 1997a; Mancuso Nichols et al. 2004; Iyer et al. 2005; Nichols et al. 2005a; Nichols et al. 2005c; Qin et al. 2007; Moppert et al. 2009), et ont servi de base à la réalisation de cette étude préliminaire.

Dans cette étude, nous avons testé la capacité de rétention de 4 EPS (NC282, NC359, NC393 et NC470), sélectionnés sur la base de leur composition osidique, vis-à-vis du nickel et du cuivre, couramment rejetés dans les effluents industriels.

A. Matériel et Méthodes

1) Mode opératoire utilisé pour les expérimentations de chélation

Les études de chélation ont été effectuées pour une concentration fixe d'EPS (0.05% poids/volume) mise en présence avec des solutions métalliques d'acétate de cuivre ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) ou de sulfate de nickel (NiSO_4) de concentrations croissantes (0 à 1 000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le cuivre et de 0 à 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pour le nickel). Dans des flacons en verre hermétiques, sont additionnés 20 mL de solution métallique et 80 mL d'une solution de polysaccharide. Les échantillons, préparés en triplicatas, sont placés sous agitation pendant une nuit à 25°C. En fin d'expérimentation, le pH de la solution est mesuré.

Les échantillons sont ensuite ultrafiltrés (seuil de coupure de 100 kDa). Le perméat contient les ions métalliques libres qui seront dosés par ICP-AES ; le rétentat contient l'EPS et les ions métalliques chélatés. Ce rétentat est lyophilisé pour analyses ultérieures en MEB (Figure 29)

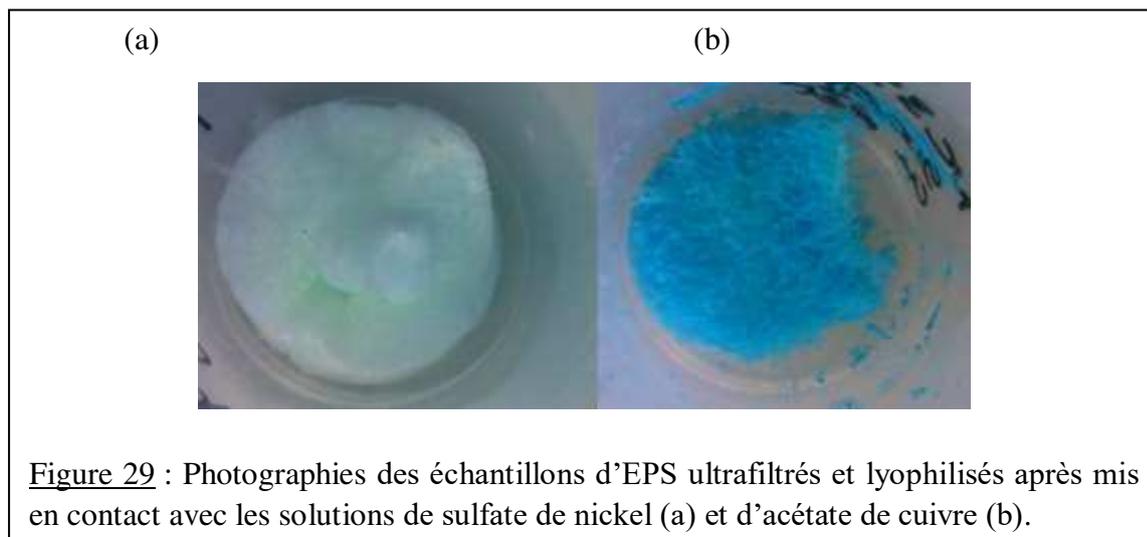


Figure 29 : Photographies des échantillons d'EPS ultrafiltrés et lyophilisés après mis en contact avec les solutions de sulfate de nickel (a) et d'acétate de cuivre (b).

2) Quantification des ions libres par ICP-AES

Les perméats sont dilués dix fois dans l'acide nitrique (HNO_3) à 2% avant d'être analysés par ICP-AES (HORIBA Jobin Yvon ULTIMA 2). L'étalonnage pour le nickel est réalisé pour des concentrations de 0 à 50 mg.L^{-1} , celui pour le cuivre couvre les concentrations de 0 à 100 mg.L^{-1} . Les analyses en ICP ont été réalisées sur des longueurs d'onde de 324,754 et 231,604 nm pour le cuivre et le nickel respectivement.

La capacité spécifique d'adsorption q est déterminée en utilisant l'équation suivante (Volesky and Holan 1995) :

$$q = \frac{(C_i - C_{eq}) \cdot V}{m}$$

Où q est la quantité de métal retenu par l'EPS (mg (métal).g^{-1} (EPS)). C_i est la concentration métallique initiale et C_{eq} , la concentration métallique à l'équilibre (mg.L^{-1}) mesurée par ICP-AES. V le volume de la solution (mL) et m la masse de l'EPS (mg).

3) Visualisation de la chélation

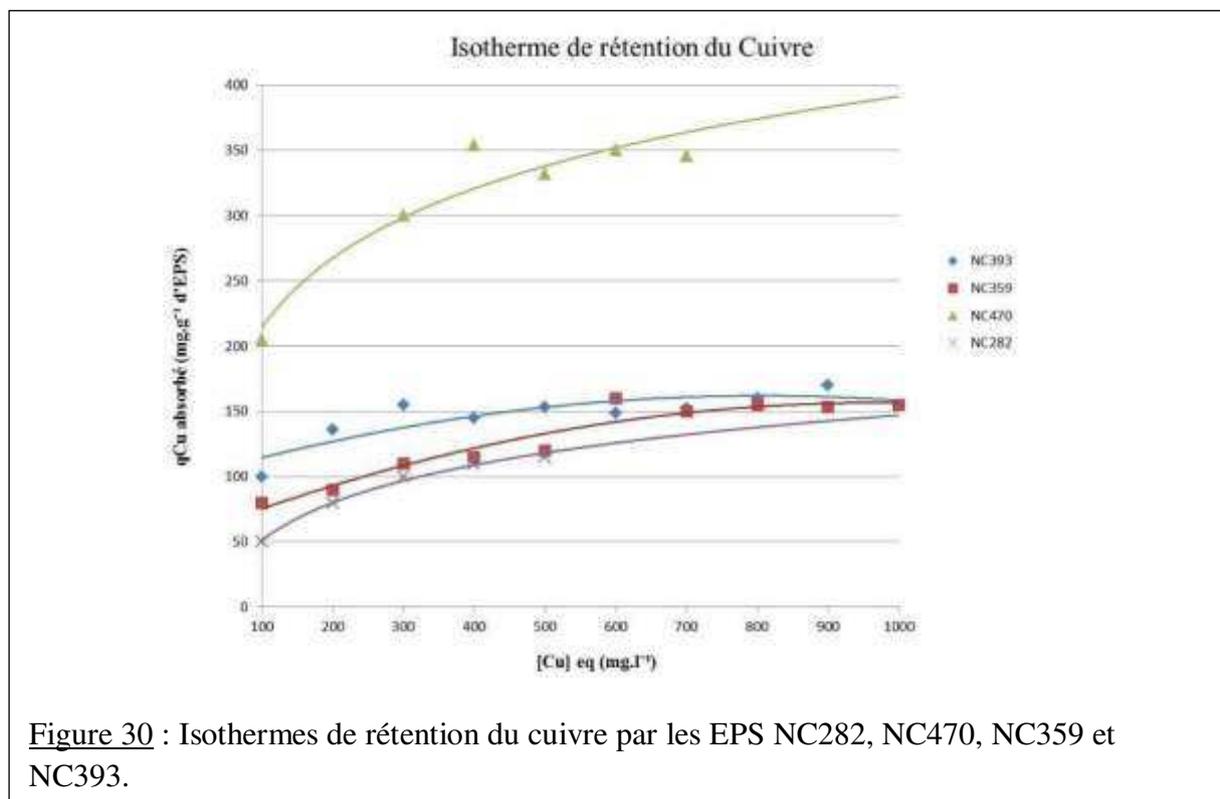
La mise en évidence de la rétention des métaux par les EPS a été réalisée par microscopie électronique à balayage classique (MEB) (Quanta 200 (FEI)) ainsi qu'à l'aide de la sonde de microanalyse à rayon X (EDS, Oxford). Les échantillons d'EPS obtenus avant et après la mise en contact avec les solutions métalliques sont observés sur le système.

B. Résultats et Discussion

1) Détermination des capacités de chélation des EPS

a. Le cuivre

Les isothermes de rétention du cuivre par les 4 EPS sont présentées en [Figure 30](#).



D'une manière générale, on constate une chélation importante du cuivre dès les plus faibles concentrations en cet élément, et une évolution rapide vers un plateau traduisant une saturation probable des sites de chélation.

Ces isothermes peuvent être modélisés par le modèle de Langmuir (Langmuir 1918), qui suit

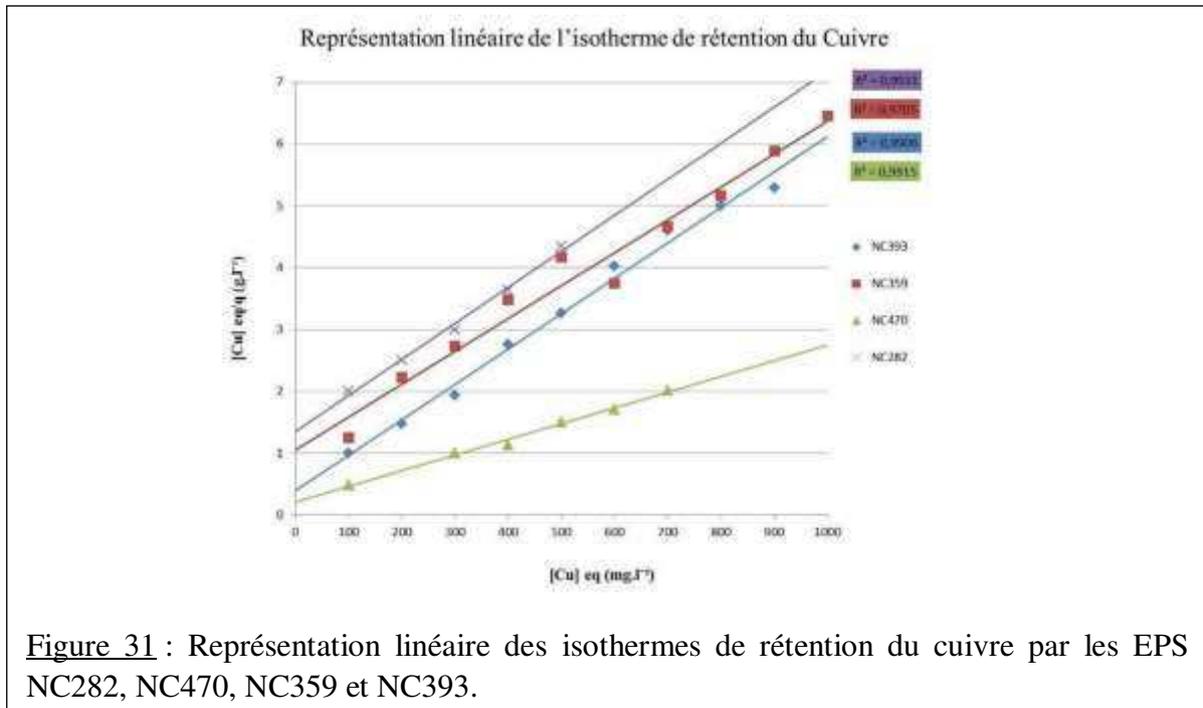
la fonction suivante :

$$q = \frac{Q_{\max} \cdot [Me]_{eq}}{K_d \cdot [Me]_{eq} + Q_{\max}} \quad (1)$$

La transformation linéaire de l'équation (1) permet d'obtenir l'équation suivante :

$$\frac{[Me]_{eq}}{q} = \frac{K_d}{Q_{\max}} + \frac{[Me]_{eq}}{Q_{\max}}$$

La représentation graphique linéaire (Figure 31) permet ainsi de quantifier la capacité de biosorption traduite par les paramètres Q_{max} (capacité spécifique de rétention du biosorbant à saturation, exprimée en mg (de métal). g^{-1} (d'EPS) et K_d (constante apparente de dissociation du métal vis à vis du biosorbant, en $mg.L^{-1}$). L'analyse du coefficient de corrélation R^2 , proche de 1, traduit l'adéquation du modèle de Langmuir pour les quatre EPS.



Les valeurs de paramètres Q_{max} et K_d obtenus pour les quatre EPS après contact avec le cuivre sont regroupés dans le Tableau 15. L'échantillon NC470 présente la plus forte capacité d'absorption avec un $Q_{max} = 357 mg.g^{-1}$ largement supérieur à celui des autres EPS. La constante apparente de dissociation ($K_d = 0,043 mg.L^{-1}$) est faible traduisant une stabilité élevée du complexe EPS NC470-Cu. Les EPS NC393, NC359, NC282, présentent des capacités de rétention plus faibles (entre 147 et 186 $mg.g^{-1}$), mais néanmoins intéressantes, et seul l'échantillon NC282 présente une affinité élevée pour le cuivre ($K_d = 0,008 mg.L^{-1}$).

Tableau 15 : Valeurs de Q_{max} ($mg.g^{-1}$) K_d ($mg.L^{-1}$) et R^2 obtenus avec le cuivre.

	NC282	NC359	NC393	NC470
R^2	0,9931	0,9705	0,9906	0,9915
Q_{max} ($mg.g^{-1}$)	147,059	185,185	181,818	357,143
K_d ($mg.L^{-1}$)	0,008	141,556	59,345	0,043

Ces valeurs sont relativement élevées par rapport à celles décrites dans la littérature aussi bien pour la biomasse bactérienne que pour les polymères (Tableau 16).

Tableau 16 : Capacité de biosorption de différentes biomasses et polymères vis-à-vis du cuivre et du nickel.

Type de Biomasse /Espèce	Type de métal	Capacité de rétention (mg.g ⁻¹) Q _{max}	Références
Wangia profunda	Cu	48	(Zhou et al. 2009)
Pantoea sp. TEM18	Cu	180	(Ozdemir et al. 2004)
Methylobacterium organophilum	Cu	200	(Kim et al. 1996)
Pseudomonas aeruginosa	Cu	23,1	(Chang et al. 1997)
Paenibacillus jamilae	Cu	40	(Morillo et al. 2006)
Bacillus sp.	Cu	16,3	(Tunali et al. 2006)
Bacillus subtilis	Cu	20,8	(Nakajima 2002)
Micrococcus luteus	Cu	33,5	(Nakajima et al. 2001)
Klebsiella aerogenes	Cu	13,2	(Bitton and Freihofer 1977)
Enterobacter sp.	Cu	32,5	(Lu et al. 2006)
Pseudomonas cepacia	Cu	65,3	(Savvaidis et al. 2003)
Pseudomonas putida	Cu	96,9	(Uslu and Tanyol 2006)
Sphaerotilus natans	Cu	60	(Beolchini et al. 2006)
Pantoea sp. TEM18	Cu	31,3	(Ozdemir et al. 2004)
Streptomyces coelicolor	Cu	66,7	(Öztürk et al. 2004)
Thiobacillus ferrooxidans	Cu	39,8	(Liu et al. 2004)
Zoogloea ramigera	Cu	323	(Norberg AB and Persson H 1984)
Paracoccus sp	Cu	333	(Deschatre et al. 2013)
Paracoccus zeaxanthinifaciens subsp. Payriae	Cu	625	(Moppert et al. 2009)
Bacillus thuringiensis	Ni	45,9	(Öztürk 2007)
Streptomyces rimosus	Ni	32,6	(Selatnia et al. 2004)
Cyanotheca ET5	Ni	25	(Micheletti et al. 2008)
Pseudomonas sp.	Ni	21	(Asthana et al. 1995)
Cyanospira capsulata	Ni	37	(Micheletti et al. 2008)
Geobacillus thermoleovorans subsp stromboliensis	Ni	42	(Özdemir et al. 2009)
Sargassum puitans	Ni	40	(Holan and Volesky 1994)
Pseudomonas aeruginosa ASU 6a	Ni	113,6	(Gabr et al. 2008)
Nostoc PCC7936	Ni	20	(Micheletti et al. 2008)

□ Biomasse

■ Polysaccharide

On note que l'EPS NC470, dont le Q_{max} s'élève à 357 mg.g^{-1} , fait partie des meilleurs candidats pour la chélation du cuivre après l'EPS produit par la souche bactérienne *Paracoccus zeaxanthinifaciens* subsp. *Payriae* (Moppert et al. 2009).

b. Le nickel

En raison d'importants problèmes de gélification des solutions d'EPS (NC470, NC282) lors de la mise en contact avec le sel de nickel, les expériences de chélation du nickel n'ont pu être réalisées qu'avec les échantillons NC393 et NC359 (Tableau 17).

Les paramètres de chélation du nickel par les EPS NC393 et NC359 ont été déterminés après vérification de l'adéquation des données au modèle de Langmuir, et sont rassemblés dans le tableau. Les isothermes sont présentés en Figure 32 et 33.

Tableau 17: Valeurs de Q_{max} (mg.g^{-1}) K_d (mg.L^{-1}) et R^2 obtenus avec le nickel.

	NC393	NC359
R^2	0,9967	0,9921
Q_{max} (mg.g^{-1})	73,529	86,207
K_d (mg.l^{-1})	39,164	3,868

Les valeurs de Q_{max} obtenues dans cette étude sont tout à fait intéressantes et compétitives par rapport aux travaux décrits dans la littérature, pour lesquels les valeurs maximales observées sont un Q_{max} de 113 mg.g^{-1} pour la biomasse bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a (Gabr et al. 2008). On note toutefois une faible affinité des complexes NC359-Ni et NC393-Ni comme indiqué par la valeur élevée de la constante de dissociation K_d .

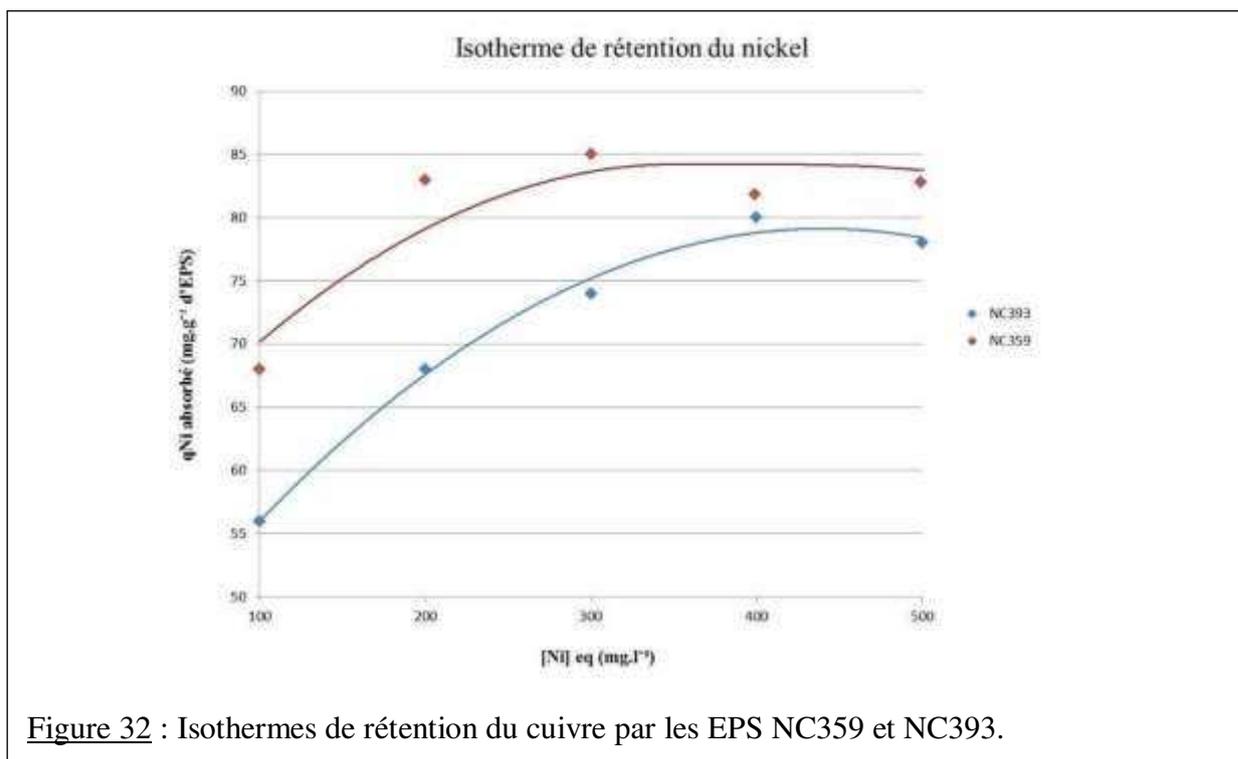


Figure 32 : Isothermes de rétention du cuivre par les EPS NC359 et NC393.

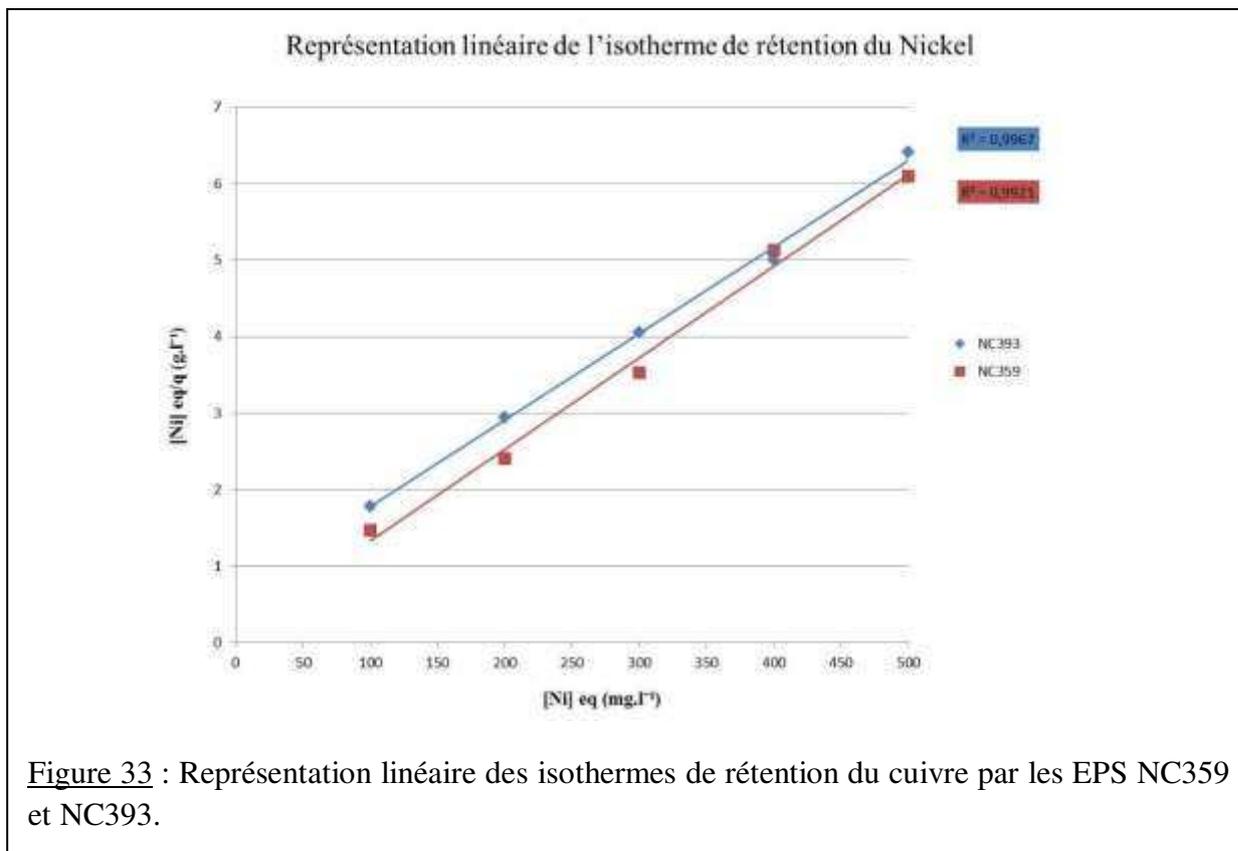


Figure 33 : Représentation linéaire des isothermes de rétention du cuivre par les EPS NC359 et NC393.

L'étude de la chélation à l'aide du MEB a été réalisée sur les EPS NC470, NC282, NC359 et NC393 après mise en contact avec le nickel.

L'observation par MEB met en évidence la structure macromoléculaire des différents EPS avant et après mise en contact avec une solution de nickel à 500 mg.L^{-1} . En deuxième approche, la microanalyse donne une estimation de la quantité d'ions au sein de l'échantillon. Les valeurs brutes doivent être considérées avec prudence au regard de l'hétérogénéité de distribution de ces ions au sein de la structure polysaccharidique.

Sur la [Figure 34](#), on observe un aspect feuilleté et dentelé pour les EPS natifs NC282, NC359 et NC393, et un aspect plus lisse pour l'EPS NC470.

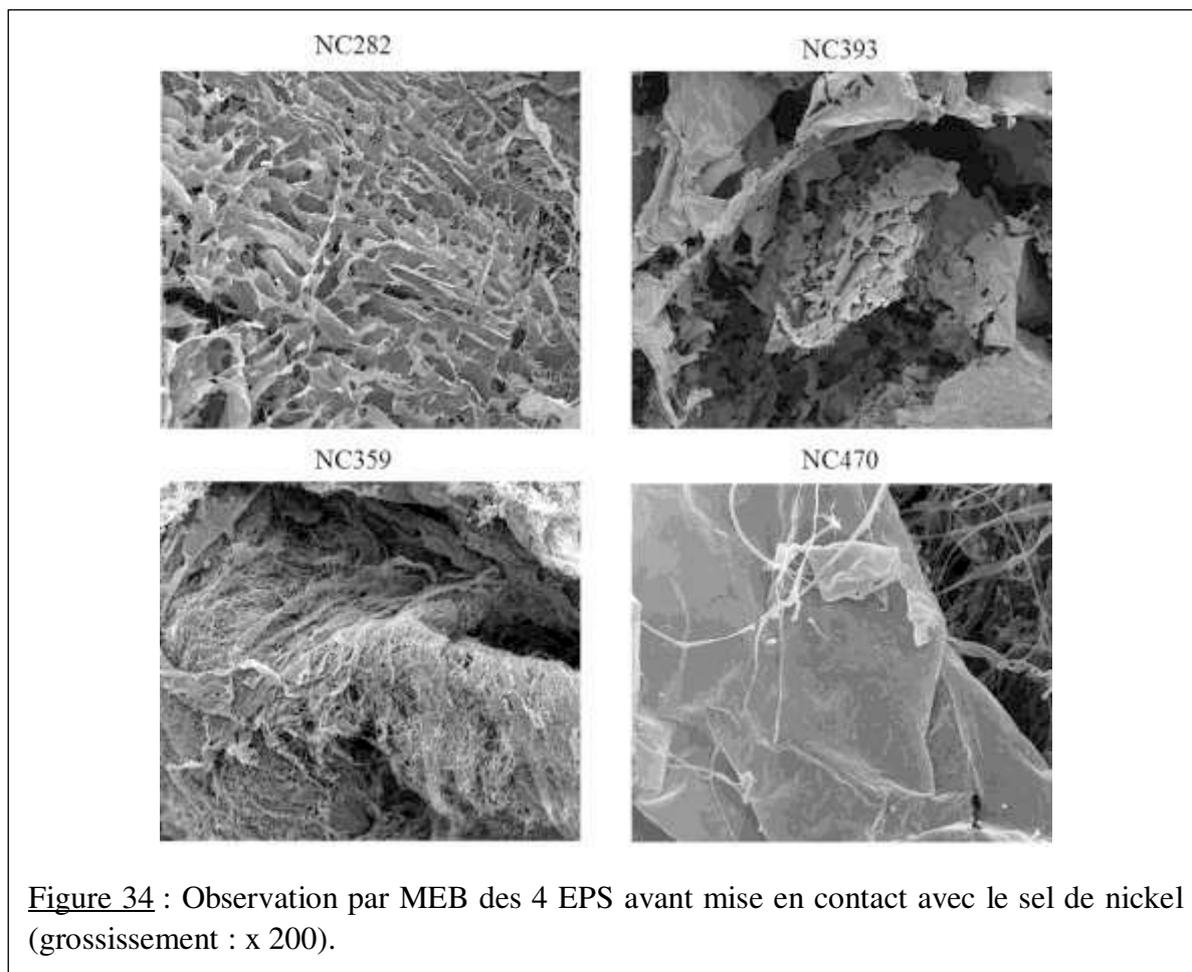


Figure 34 : Observation par MEB des 4 EPS avant mise en contact avec le sel de nickel (grossissement : x 200).

Ces échantillons ont été observés en MEB après l'expérience de chélation en présence de nickel. On note alors, sur certains d'entre eux, l'apparition de structures sphériques localisées en surface de la matrice principale constituée par le polymère (Figure 35). Une microanalyse dirigée vers ces sphères indique une charge importante en nickel.



Figure 35 : Observation par MEB de l'EPS NC470 après mise en contact avec le sel de nickel. Visualisation de structures sphériques chargées en nickel (grossissement x800)

Comme nous l'avions précédemment constaté par les analyses ICP- AES, les résultats obtenus sur l'EPS NC470 en MEB couplé à la microanalyse confirment une capacité de chélation supérieure de l'EPS NC470 pour le nickel, avec un taux estimé à 20%. (Tableau 18).

Tableau 18 : Mesures spectrales réalisées par microanalyse pour le nickel au sein des EPS.

Échantillon	[sulfate] %	[nickel] %
NC282	4,8	10,6
NC359	7,1	15,0
NC393	6,8	13,0
NC470	7,8	20,3

C. Conclusion

Les résultats préliminaires obtenus dans cette étude sur les capacités de rétention des EPS pour le nickel et le cuivre démontrent le potentiel de certains EPS produits par des bactéries de Nouvelle-Calédonie comme agents de chélation efficaces vis-à-vis de ces métaux. L'EPS NC470 présente les plus fortes valeurs de Q_{max} ($Q_{max} = 357,143 \text{ mg.g}^{-1}$ pour un $K_d = 0,043 \text{ mg.L}^{-1}$).

Plusieurs propriétés peuvent contribuer à ce pouvoir de chélation, notamment la présence de groupements chimiques chargés négativement favorisant la captation des cations ; le comportement du polymère en solution (rhéologie), sa conformation (linéaire, ramifié) qui va également déterminer l'accessibilité des sites réactionnels, ou encore le volume de l'ion considéré. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de groupements chimiques tels que les sulfates, les acides uroniques et les phosphates dans la captation des ions par les EPS, même si d'autres paramètres existent comme les interactions électrostatiques entre les groupements hydroxyles (Hans-Cur 1995; Prado Acosta et al. 2005; Singh et al. 2006).

Dans le cas de l'EPS NC470, les analyses chimiques ont montré un taux élevé en acides uroniques et osamines. Ces oses chargés négativement jouent probablement un rôle majeur dans la capacité de ces biopolymères à chélater des ions métalliques et en particulier les ions divalents (Loaëc et al. 1997a). De la même manière, on remarque que le NC359, également composé en majorité d'acides uroniques et d'hexosamines, présente des propriétés chélatrices intéressantes ($Q_{max} = 185,185 \text{ mg.g}^{-1}$). À l'inverse, les EPS NC282 et NC393, essentiellement composés d'oses neutres, affichent les plus faibles taux de chélation vis-à-vis des deux métaux étudiés.

Dans le cas des 4 d'EPS étudiés, on observe que chacun d'entre eux affiche une différence au niveau de la capacité de rétention des deux ions divalents (Cu^{2+} , Ni^{2+}), le Cu^{2+} étant généralement mieux retenu par l'EPS que le Ni^{2+} . La faculté des EPS bactériens à chélater préférentiellement certains ions est un phénomène décrit. (Loaëc et al. 1997b; Bhaskar and Bhosle 2006). À titre d'exemple, une étude menée sur *Rhizobium etli* a montré que ses EPS captaient préférentiellement et rapidement le manganèse par rapport au nickel ou

au plomb (Foster et al. 2000). Une autre étude sur *Paenibacillus jamilae* a également mis en évidence une chélation préférentielle pour le plomb (Morillo et al. 2006). Dans chaque cas, plusieurs hypothèses ont été évoquées, telles que le rôle du pH, ou encore la conformation propre de chaque EPS ainsi que le volume et la valence des différents ions métalliques (Guibaud et al. 2008).

Au cours de cette étude préliminaire, l'influence du pH sur la chélation des ions métalliques n'a pas été abordée. Or des variations de ce paramètre peuvent fortement affecter les capacités de chélation des EPS, influant à la fois la spéciation du métal et la structure de l'EPS (confirmation, charge des groupements fonctionnels, etc...) (Singh et al. 2006; Wang and Chen 2009; Poli et al. 2010). Nous avons toutefois mesuré les valeurs de pH en fin d'expérimentations. Ces valeurs se situent entre 5,5 et 6,7 selon les EPS et les métaux étudiés (Tableau 19). D'après les données disponibles dans la littérature, ces valeurs de pH expérimental cohérentes avec la gamme de pH optimal de chélation des métaux qui se situe entre 4 et 6 (Esposito et al. 2002; Veglio et al. 2002; Shin et al. 2004; Guibaud et al. 2008; Zhou et al. 2009).

Tableau 19 : Valeurs de pH mesurées en fin d'expérimentations de mise en contact des EPS et des solutions métalliques.

	NC393	NC359	NC470	NC282
Cuivre	5,95	5,65	5,62	5,53
Nickel	5,96	5,73	5,77	6,69

Dans une optique de valorisation liée à l'aspect « chélation des métaux par les EPS », des expérimentations précises prenant en compte l'influence du pH, ainsi que d'autres facteurs tels que la salinité ou la compétitivité en solution multiéléments devront être menées.

IV. Conclusion de la partie III

L'étude menée sur le potentiel des EPS produits en conditions de laboratoire par des souches bactériennes marines de Nouvelle-Calédonie a montré une capacité importante de ces bactéries à synthétiser des exopolymères (54,35%), au regard de la présence de colonies muqueuses sur milieu solide. Au total, 43 souches ont fait l'objet d'études complémentaires visant notamment la détermination des conditions optimales de croissance et la production de polysaccharide en milieu liquide. Une dizaine d'EPS a ainsi été produite par fermentation bactérienne, atteignant des rendements de l'ordre de 2 à 5g.L⁻¹ d'EPS. Ces structures ont été caractérisés chimiquement (composition globale, ratios monosaccharidiques, poids moléculaire).

L'analyse chimique des échantillons confirme un faible taux en protéines, attestant ainsi de l'efficacité du protocole de purification par ultrafiltration. D'autre part, la composition glycosidique des échantillons met en évidence des structures riches en acides uroniques et hexosamines plus particulièrement chez les espèces appartenant au genre *Vibrio*.

Sur la base des connaissances de la chimie de ces biopolymères (composition osidique, ratios monosaccharidiques), nous avons sélectionné 4 EPS (NC470, NC282, NC359, NC393) présentant des compositions différentes, plus ou moins chargés, pour une étude visant à étudier leur capacité de rétention des ions métalliques : Cu²⁺ et Ni²⁺. La capacité de chélation semble liée à la présence au sein du polymère de groupements fonctionnels chargés. En effet les EPS NC470 et NC359 contiennent une part importante d'acides uroniques et d'hexosamines piègent efficacement les deux sels d'ions métalliques, plus particulièrement l'EPS NC470 pour lequel les plus fortes capacités de chélation sont obtenues (Q_{max} = 357,143 mg.g⁻¹ pour le Cu²⁺ et de 20% pour le Ni²⁺ soit un Q_{max} estimé à 114,9 mg.g⁻¹). En revanche, les EPS NC282 et NC393 composés majoritairement d'oses neutres sont moins efficaces. Ces résultats préliminaires sont tout à fait intéressants et permettent d'ores et déjà d'envisager une utilisation de l'EPS NC470 pour ses capacités de chélation. Cependant, des expérimentations complémentaires sont nécessaires afin d'optimiser et de contrôler

l'interaction polymère-métal (problème de gélification des échantillons, pH, compétitivité inter-ions).

Les EPS, grâce à leurs propriétés biologiques, chimiques, et rhéologiques, trouvent des applications comme agents épaississants, gélifiants, émulsifiants, stabilisants, séquestrants, hydratants, filmants... peuvent intéresser de nombreux secteurs de l'industrie (agroalimentaire, cosmétique, santé, environnement...). Dans le cas particulier de la Nouvelle-Calédonie, nous envisageons d'ores et déjà une application des EPS dans le domaine cosmétique, en demande constante pour de nouveaux composés naturels aux propriétés hydratantes avec certaines activités biologiques (cicatrisante, antiride, apaisante).

Un autre secteur d'intérêt sur le territoire néo-calédonien concerne la problématique environnementale. Les EPS et /ou de la biomasse bactérienne en tant qu'agents chélatants pourrait être développé pour la bioremédiation des métaux, comme alternative propre et économiquement viable à la précipitation chimique des ions métalliques issus des rejets industriels (Volesky and Naja 2005; Wang and Chen 2009).

D'autres secteurs porteurs devraient également être explorés notamment pour des applications contre les salissures marines avec une utilisation en tant qu'antifouling. Dans le contexte de la Nouvelle-Calédonie où la plaisance représente une activité importante, cette perspective de valorisation pourrait être développée.

Les possibilités de valorisation des EPS sont très vastes et offrent une large gamme d'applications. Les premières données et expériences menées au cours de cette étude doctorale sur les polymères produits par les bactéries de Nouvelle-Calédonie ouvrent une nouvelle voie de développement en biotechnologie et des perspectives de recherches intéressantes (santé humaine, biomatériaux, agriculture) sur le territoire de Nouvelle-Calédonie.

PARTIE IV : Étude de quelques PHA produits
par des Bactéries de Nouvelle-Calédonie

I. Matériel et méthodes

A. Le criblage des souches

Étant donné les limites des techniques de criblage phénotypique basées sur la coloration des corps lipidiques (Nile Red , Nile blue or Sudan Black) (Kitamura and Doi 1994) ou l'observation de la croissance des colonies sur différents milieux favorables à la synthèse de PHA, un des objectifs de cette thèse a été de mettre au point une nouvelle technique de criblage des bactéries productrices de PHA basée sur la détection spécifique des gènes impliqués dans la synthèse de ces PHA.

Nous avons donc eu recours à la biologie moléculaire, notamment par PCR, pour mettre en place deux tests, le premier que nous avons mis au point pour la détection des bactéries capables de produire des PHA scl, et le second adapté des travaux de Solaiman (Solaiman et al. 2000) permettant la détection des bactéries capables de produire des PHA mcl.

1) Mise au point du test de criblage moléculaire pour la détection des bactéries productrices de PHA scl

a. Principe et méthode

Très peu de données sont disponibles dans la littérature quant au criblage par PCR des bactéries productrices de PHA scl. Partant des travaux de Sheu et son équipe (Sheu et al. 2000) décrivant la mise en évidence par PCR du gène *phaC* codant pour l'enzyme PHA synthase de type I impliquée dans la synthèse des PHA scl, nous avons testé les amorces décrites par ces auteurs sur des souches bactériennes marines de Nouvelle-Calédonie

appartenant au genre *Vibrio* et dont la capacité de production des PHA scl est connue (Sun et al. 1994; Chien et al. 2007; Arun et al. 2009; Wei et al. 2011; Boroujerdi et al. 2012; Numata and Doi 2012; Subin et al. 2013). Cependant, malgré les essais d'optimisation des conditions de la PCR, aucune amplification spécifique n'a pu être observée. Dans les travaux de Sheu, le criblage était réalisé sur des bactéries terrestres essentiellement. Or l'alignement réalisé à partir des séquences nucléotidiques de PHA scl disponibles sur des bases de données a permis de mettre en évidence des disparités au niveau des régions conservées entre les espèces terrestres et marines. Nous avons ainsi entrepris de dessiner des nouvelles amorces afin de cribler la collection pour la recherche de bactéries marines produisant des PHA scl.

Ainsi suite à l'alignement de 25 séquences de *phaC* de type I (que l'on peut retrouver sous le terme de « PHB synthase gene ») de bactéries marines obtenues de bases de données, nous avons pu définir des régions nucléotidiques relativement bien conservées et dessiner des amorces. Les amorces ont ensuite été testées sur des bactéries productrices de PHA scl. Ces résultats nous ont permis de sélectionner un couple d'amorces dont l'amplicon atteignait une taille d'environ 750 pb.

Les séquences du couple d'amorces sont les suivantes :

LMRf1 : 5'-CCGCCBTKBATCAACAARTWCTAYATYCTBGA-3'

LMRr3 : 5'-GGRTTGAYSAYRCCVGCRA TRTGGCC-3'

b. La mise en place du protocole expérimental

La technique de criblage des PHA scl développée dans cette étude est présentée dans l'article « Rapid PCR method for the screening of marine bacteria producing short chain length PHA. », actuellement en cours de rédaction. C'est une technique rapide et spécifique par PCR permettant le criblage haut débit des bactéries marines capables de produire des PHA scl.

2) Test PCR pour la détection des bactéries productrices de PHA mcl

a. Principe et méthode

Le protocole de criblage des PHA mcl a été inspiré des travaux de Solaiman (Solaiman et al. 2000) et permet de rechercher le gène phaC codant pour la PHA synthase de type II. Les amorces utilisées dans cette étude sont les suivantes :

I-179L : 5'-ACAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGAC-3'

I-179R : 5'-GGTGTGTCGTTGTTCCAGTAGAGGATGTC-3'

Elles permettent d'obtenir un fragment de 540 pb qui est ensuite révélé par migration sur gel d'agarose (2%).

b. La mise en place du protocole expérimental

- *Extraction d'ADN bactérien* : une colonie bactérienne est prélevée sur gélose Zobell, resuspendue dans 50 µL d'eau milliQ puis chauffée 10 min à 95°C. Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé (14000 rpm/ 10 min). Le surnageant contenant l'ADN de la souche à tester est récupéré dans un tube propre.
- *Amplification du gène phaC* : Le mélange de PCR utilisé pour chaque échantillon est le suivant :

Volume (µl)	Produit
12	H ₂ O
2,5	Tampon 10x
1,2	I-179L
1,2	I-179R
2,5	MgCl ₂ (25mM)
2,5	dNTP (2mM)
0,25	Enzyme
22,15	Total

Une fois le mix préparé et 1 μ L de l'ADN extrait ajouté le tout est placé dans un thermocycleur et suit le programme d'amplification suivant :

95°C 5'	1 cycle
94°C 1'	} 30 cycles
54°C 1'	
72°C 1'	
72°C 5'	1 cycle
4°C	

Les réactions de PCR sont ensuite déposées sur un gel d'agarose à 2% en présence de marqueurs de poids moléculaire. Une fois l'électrophorèse réalisée, les amplicons de taille 540 pb correspondant au fragment du gène PHA mcl amplifié sont recherchés sous lumière UV.

B. Production des PHA

La production de PHA est réalisée en 2 étapes, la première en milieu Zobell afin d'obtenir une densité cellulaire importante, le deuxième dans un milieu dépourvu d'azote et enrichi en source de carbone afin de limiter la division cellulaire et favoriser la synthèse et l'accumulation intracellulaire des PHA.

Pour la phase de production de biomasse, deux erlenmeyers contenant 2L de milieu Zobell (par litre d'eau distillée : 5g de peptone, 1g d'extrait de levure, 15g de Sea Salts et pH ajusté à 7,6 avec une solution de NaOH 2N) sont inoculés à 10% (v/v) avec une suspension de cellules en phase exponentielle. Les erlenmeyers sont agités à la température de croissance optimale de la souche pendant 6h à 8 h. Après centrifugation (8000g pendant 20min, en conditions stériles) les culots bactériens sont transférés dans un fermenteur contenant 5 L de milieu 'limitant' favorisant la production des PHA. Le milieu limitant est composé d'eau de mer (par litre d'eau distillée : 15g de Sea Salt) appauvrie en tout autre élément, notamment en azote, et enrichi en carbone. Différents substrats carbonés ont été testés dans cette étude : selon la nature de la souche bactérienne utilisée et la nature du PHA produit : glucose (10 g.L^{-1}), acide valérique (3 g.L^{-1}), huile de coprah (10 g.L^{-1}), acide octanoïque (3 g.L^{-1}) et acide undécenoïque ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$), seuls ou en mélange.

Au cours de la fermentation, le pH est maintenu automatiquement au pH optimum par addition d'une solution de NaOH 2N ou d'une solution de H₂SO₄ 2N, la température appliquée correspond à la température optimale de la souche, et le niveau d'oxygène est maintenu inférieur à 25% par un contrôle de l'agitation. Pour certaines souches quelques gouttes d'antimousse (Pluronic PE 6100) sont ajoutées pour éviter la formation d'une émulsion. Après 3 jours, les cellules sont récupérées par centrifugation (8000g pendant 20 min), lavées deux fois avec de l'eau de mer diluée, puis le culot bactérien est lyophilisé avant analyse.

C. Extraction et purification des PHA

Les cellules lyophilisées sont réduites en poudre dans un mortier et extraites à l'aide de chloroforme (15 mL pour 1 g de Masse de Cellules Sèches MCS) pendant 4h à 50°C. Un volume d'eau (1/3) est ajouté, le mélange est agité puis centrifugé pour séparer les deux phases des débris cellulaires. La phase organique est alors récupérée, évaporée et le solide obtenu est conservé pour les analyses. La purification du PHA est réalisée par plusieurs précipitations successives d'une solution chloroformique de PHA dans 10 volumes de méthanol froid.

D. Caractérisations des PHA

1) Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN ^1H)

Les analyses RMN ^1H sont réalisées à 25°C sur des échantillons de PHA dissous dans du chloroforme deutéré sur un spectromètre Bruker 400 DRX opérant à 400MHz. Les déplacements chimiques sont reportés en ppm relativement au signal du 3,3,3,4-tétraméthyl silane.

2) Analyse Enthalpique Différentielle (AED)

La calorimétrie différentielle à balayage est réalisée sur un TA Instrument DSC Q200. Les échantillons de l'ordre de 5 à 10 mg sont encapsulés entre un pan et un lid en aluminium et chauffés de -70°C à 200°C à 10°C.min⁻¹ sous un flux d'azote. La température de fusion T_m et l'enthalpie de fusion sont prises de l'endotherme de fusion et la température de transition vitreuse T_g est prise au point d'inflexion du changement de capacité calorifique.

3) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

Les analyses IRTF sont réalisées directement sur les échantillons de PHA purifiés ou sur les cellules lyophilisées, à l'aide du spectromètre Nicolet iS10 ThermoScientific en détection ATR. Pour cela l'échantillon est déposé sur un disque de germanium, puis analysé avec un balayage de longueurs d'ondes allant de 4000 cm^{-1} à 600 cm^{-1} (64 scans).

4) Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Pour déterminer leur composition monomérique, 7mg de PHA dissous dans 1,5mL de chloroforme sont méthanolysés en présence de 1,5mL d'une solution de MeOH/HCl (17/2, v/v) à 100°C pendant 4h. La phase organique est ensuite lavée par 1mL d'eau puis séchée sur MgSO_4 . La silylation des esters méthyliques est réalisée en ajoutant 100 μL de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide) et 100 μL de pyridine à l'échantillon méthylé. La solution est chauffée à 70°C pendant 1h puis évaporée à sec. L'échantillon est alors dissous dans 600 μL de dichlorométhane et injecté en CPG-SM permettant de déterminer la longueur de la chaîne carbonée de chaque monomère ainsi que le nombre de doubles liaisons au sein des monomères.

La localisation de la double liaison au sein des monomères a été réalisée selon la méthode décrite par Simon-Colin (Simon-Colin et al. 2012a). Pour cela, les esters méthyliques sont acétylés dans 100 μl de chlorure d'acétyle à 65°C pendant 5 minutes, puis le mélange est évaporé à sec sous azote. Une thiométhylation est alors réalisée par addition de 500 μl d'hexane, 100 μL de diméthylsulfide DMDS (100 μl) et 20 μL d'iode, suivie d'une incubation à 50°C pendant 48h. Les échantillons sont dilués dans 200 μL d'hexane et l'excès d'iode est réduit par addition de Na_2SO_3 . Après centrifugation (8 minutes, 3000 g), les dérivés 3-O-acétyle thiométhyle méthyle esters sont récupérés dans le surnageant, évaporés sous azote, puis repris dans 500 μl de dichlorométhane avant d'être injectés en CPG-SM.

Le système CPG-SM est composé d'un chromatographe Agilent Technologies 6890N couplé à un spectromètre quadripolaire Agilent 5975 inert XL, équipé d'une colonne capillaire de

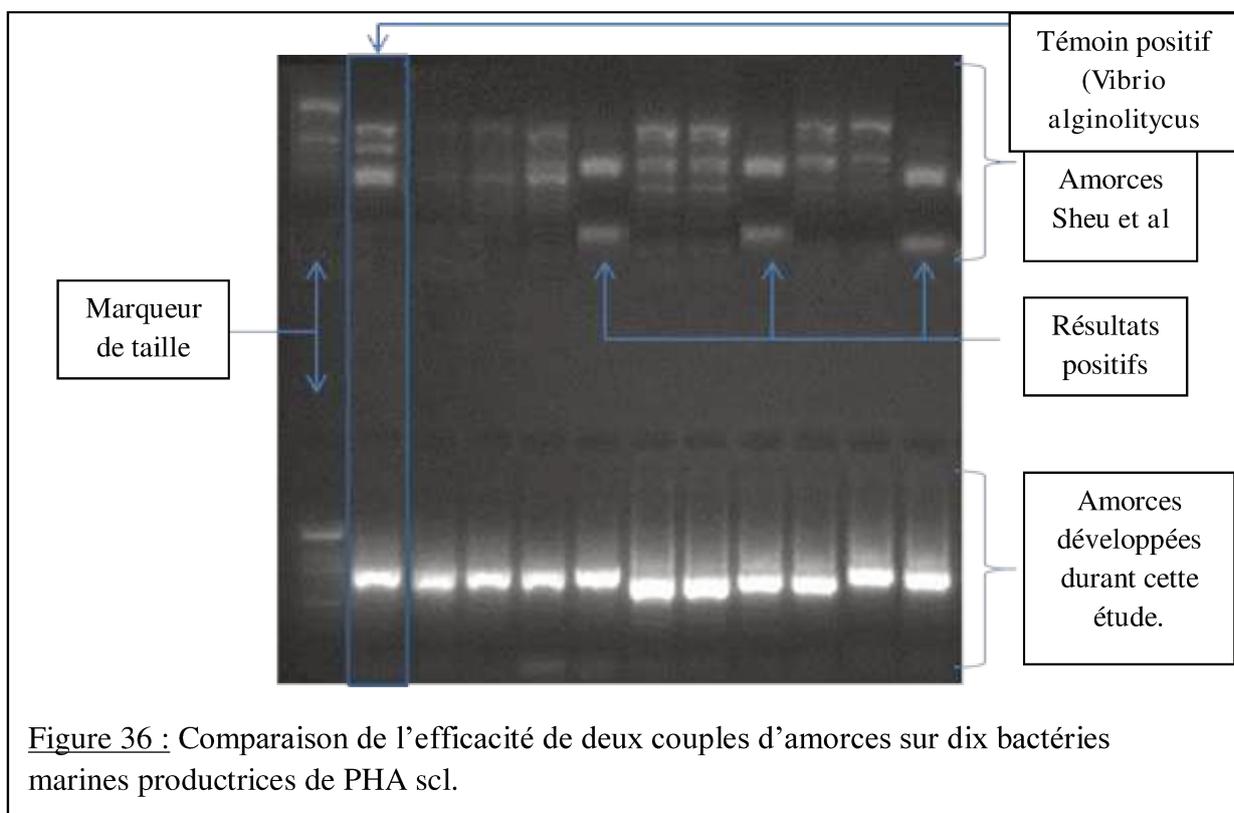
silice HP5-MS (30m x 0,25mm, 0,25 μ m d'épaisseur de film). Un volume de 1 μ L est injecté (split ratio 100:1) à 250°C avec de l'hélium comme gaz vecteur et le programme de température suivant : 60°C pendant 1 min, puis rampe de 4°C.min⁻¹ jusqu'à 140°C, puis 15°C.min⁻¹ jusqu'à 280°C et 5min à 280°C. Le potentiel d'ionisation pour l'impact électronique est de 70eV.

II. Résultats et Discussion

A. Le criblage

1) Recherche de bactéries productrices de PHA scl

Le criblage moléculaire visant à mettre en évidence les souches productrices de PHA scl a été effectué sur 414 isolats. Sur ces 414 isolats, 187 présentaient un amplicon d'environ 750 pb. Le produit de PCR de 45 échantillons sur 187 a été séquencé. Les séquences nucléotidiques obtenues ont ensuite été analysées et présentaient 85 à 97% d'homologie avec le gène codant pour la PHA synthase de type I avec des séquences appartenant à des souches de référence. Nos résultats semblent indiquer que les amorces LMRf1 et LMRr3 nouvellement dessinées sont plus efficaces pour le criblage des bactéries marines potentiellement productrices de PHA scl (Figure 36).



Les 45 isolats ont ensuite été partiellement identifiés (séquençage de la sous-unité ribosomique 16S) permettant l'identification de six genres bactériens : Photobacterium,

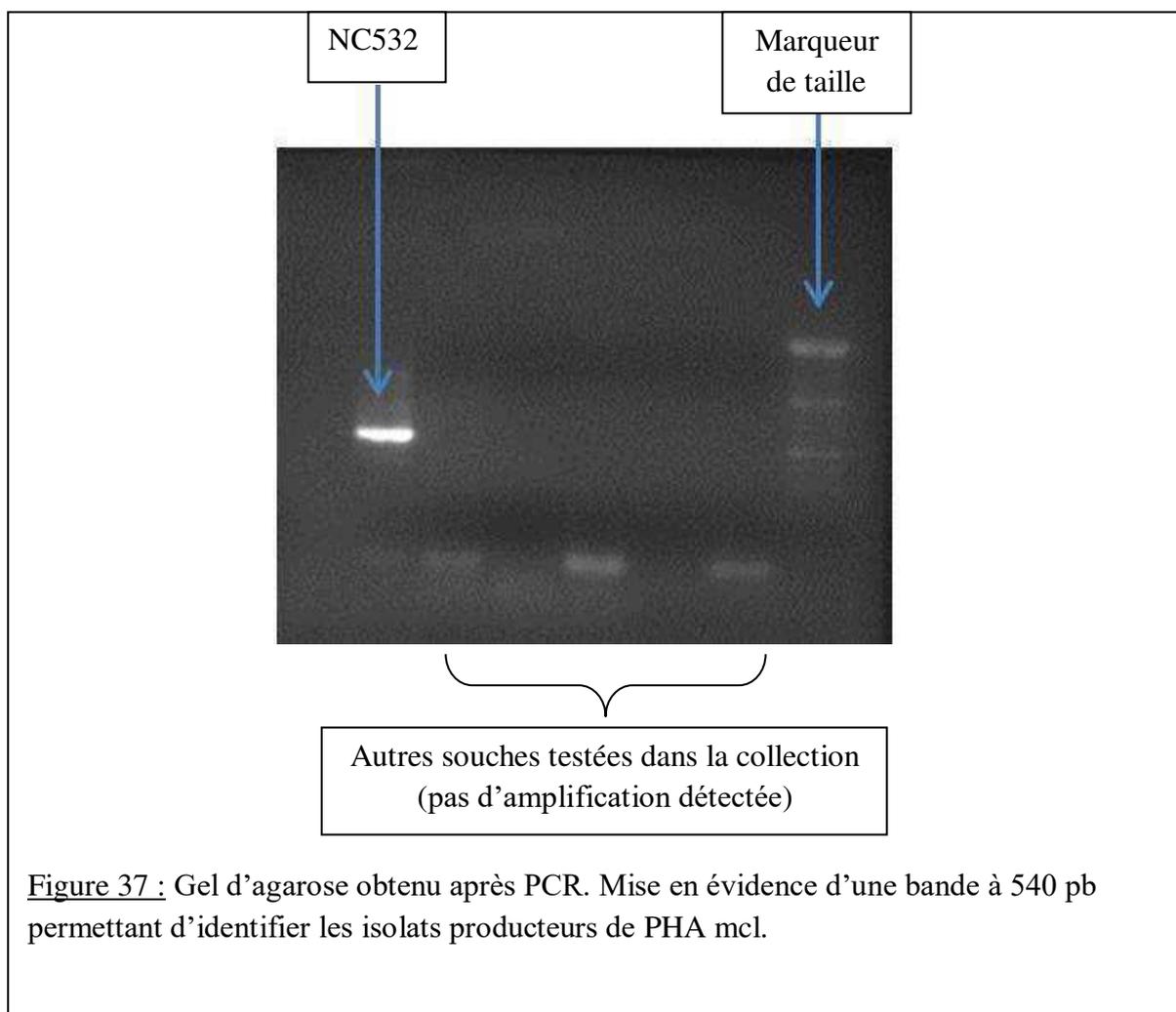
Salinivibrio, Vibrio, Pseudoalteromonas, Marinomonas (γ -Proteobacteria) et Ruegeria (α -Proteobacteria). Certaines espèces appartenant à ces genres sont produisent des PHA scl, comme Vibrio avec la description de certaines espèces produisant du PHB (Sun et al. 1994; Chien et al. 2007; Arun et al. 2009; Wei et al. 2011; Boroujerdi et al. 2012; Numata and Doi 2012), ou encore Salinivibrio, Photobacterium (Boyandin et al. 2007) et Pseudoalteromonas (Villanueva et al. 2010). En revanche aucune donnée n'est disponible, à notre connaissance, pour les genres Marinomonas et Ruegeria.

Enfin, parmi ces 45 isolats, 10 ont été sélectionnés pour une production de PHA scl en condition de fermentation. L'objectif était de confirmer la fiabilité du criblage mis en œuvre et de caractériser les PHA scl produits.

2) Recherche de bactéries productrices de PHA mcl

Ce travail de criblage a été effectué sur l'ensemble de la collection (771 isolats). Il a permis d'identifier la souche NC532 exprimant le gène de la PHA synthase de type II codant pour les PHA mcl (Figure 37). Cette souche NC532 a été collectée au niveau des sources hydrothermales résurgentes de la baie de Prony. Afin de valider ce résultat de criblage, l'amplicon obtenu a été séquencé. La séquence amplifiée correspond effectivement au gène codant pour la PHA synthase de type II (94% d'homologie avec *Pseudomonas aeruginosa*). Le séquençage 16S réalisé a permis de préciser que la souche NC532 appartient au genre *Pseudomonas*. Ce résultat est en accord avec les travaux de la littérature où une part importante des espèces productrices de PHA mcl appartiennent au genre *Pseudomonas* (de Smet et al. 1983; He et al. 1998; Barbuzzi et al. 2004; Simon-Colin et al. 2008a; Rai et al. 2011; Wang et al. 2011; Simon-Colin et al. 2012b). On note tout de même que quelques rares espèces appartenant aux genres *Comamonas* (Thakor et al. 2005) et *Burkholderia* (Ciesielski et al. 2006) ont été criblées avec succès par cette méthode. Ces observations confirment donc que les amorces I-179L et I-179R ne sont pas spécifiques du genre *Pseudomonas*, mais peuvent être utilisées sur d'autres genres bactériens. Le test de criblage que nous avons utilisé paraît fiable, même s'il n'a permis d'identifier qu'une seule bactérie potentiellement

productrice de PHA mcl : la souche NC532. Afin de confirmer ce résultat, une production de PHA mcl à partir de la souche NC532 a été réalisée par fermentation.



B. Production de PHA

Différents substrats carbonés ont été testés sur plusieurs souches bactériennes dans le but de produire des polyesters bactériens appartenant à la catégorie des PHA scl, notamment PHB, PHBV et des PHA mcl saturés ou insaturés.

1) Les PHA à courtes chaînes

La production de PHA scl a été réalisée sur dix souches ayant répondu positivement au criblage PCR : NC14, NC15, NC21, NC23, NC282, NC283, NC470, NC493, NC615 et NC617. Ces dix souches appartiennent à 6 genres différents : *Vibrio* (NC470 et NC493), *Salinivibrio* (NC15 et NC15), *Photobacterium* (NC21 et NC23), *Pseudoalteromonas* (NC412), *Marinomonas* (NC615) et *Ruegeria* (NC617).

Les cultures ont été réalisées sur glucose (10g.L^{-1}) comme unique source de carbone, ce qui aboutit couramment à la synthèse du PHB. D'autres ont été effectués avec un mélange de glucose (10g.L^{-1}) et d'acide valérique (3g.L^{-1}) afin d'orienter le métabolisme bactérien vers la synthèse d'un copolymère de PHBV.

Les résultats de la production de PHA scl sont rassemblés dans le [Tableau 20](#). Les meilleurs rendements sont obtenus avec la souche NC470 avec une valeur maximale de 4,5g de PHA (soit un rendement de 45%) obtenu sur glucose (10g.L^{-1}). Pour les autres souches testées, on note que les plus productives en PHA scl appartiennent à la famille des Vibrionaceae : *Vibrio* (NC470 et NC493), *Salinivibrio* (NC15 et NC15) et *Photobacterium* (NC21 et NC23) avec des rendements de 21 à 45%. Les souches appartenant aux genres *Pseudoalteromonas* (NC412), *Marinomonas* (NC615) et *Ruegeria* (NC617) n'ont donné que de faibles rendements (entre 8 et 15%).

Tableau 20 : Résultats de la production de PHA scl par les souches issues du criblage.

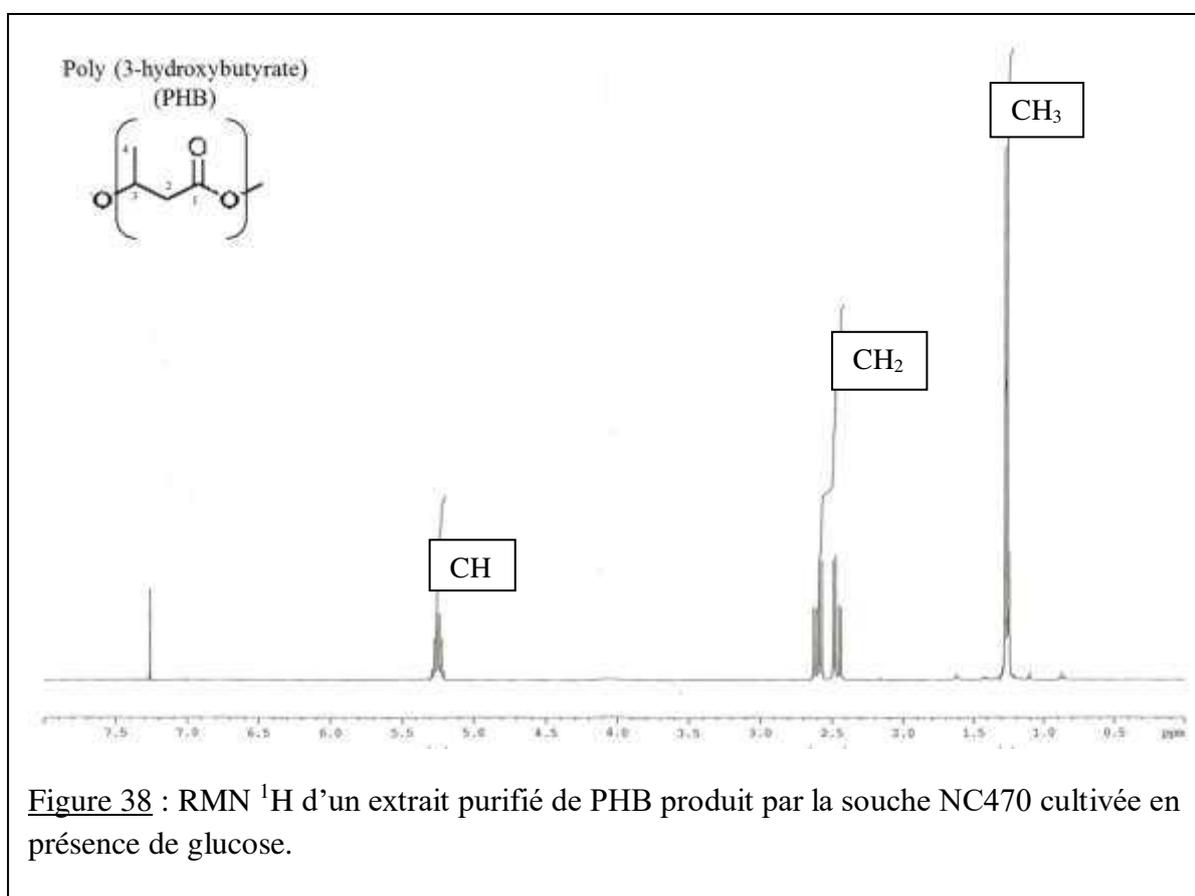
Souches	Source carbone	MCS (g)	Mextrait (g)	Rendement (%)
NC470	Glucose (10g/L) + Valérate (3g/L)	16,6	0,45	2,71
	Glucose (10g/L)	10	4,5	45
NC493	Glucose (10g/L)	1,3	0,465	35,8
NC15	Glucose (10g/L)	1,26	0,34	27,5
NC14	Glucose (10g/L)	1,1	0,325	29,6
NC21	Glucose (10g/L)	1,15	0,256	22,3
NC23	Glucose (10g/L)	1,05	0,226	21,6
NC282	Glucose (10g/L)	1,41	0,214	15,2
NC283	Glucose (10g/L)	1,32	0,205	17,1
NC615	Glucose (10g/L)	0,9	0,072	8,1
NC617	Glucose (10g/L)	1,03	0,106	10,3

MCS est la masse de cellules sèches obtenues après lyophilisation du culot bactérien,

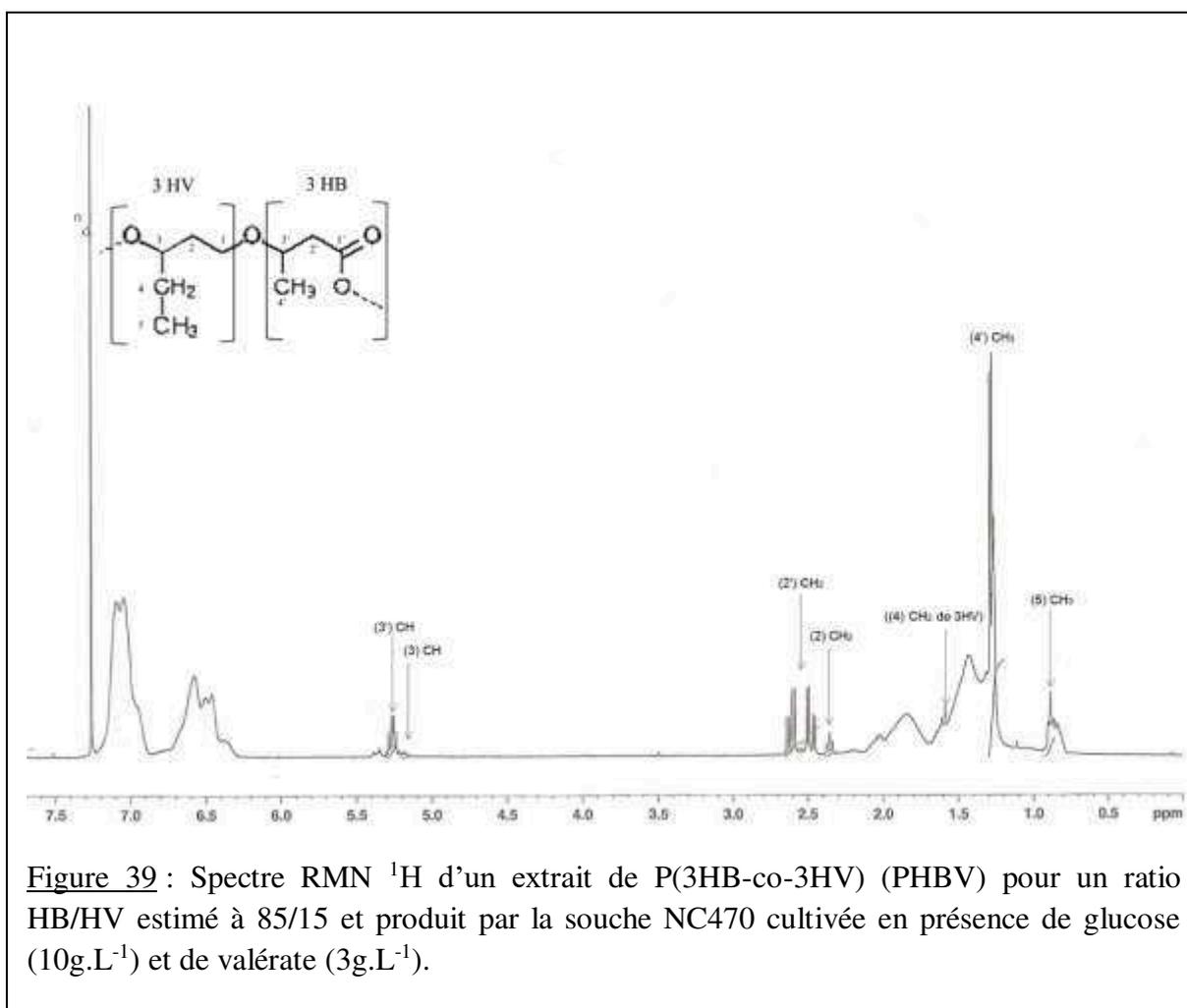
Mextrait est la masse de polymère purifié.

Dans le cas des PHA à courte chaîne, la RMN haute résolution en détection proton a été utilisée comme outil d'analyse rapide pour la caractérisation des PHA et la détermination du ratio monomérique 3HB/3HV.

Les souches cultivées uniquement en présence de glucose comme source de carbone produisent un PHA de structure cassante, et opaque. L'analyse RMN ^1H permet de caractériser un poly(3-hydroxybutyrate) PHB avec un doublet à 1,26 ppm attribué au groupement méthyle (CH_3) de la chaîne carbonée, le signal à 5,25 ppm correspond au proton porté par le carbone asymétrique et un signal à 2,54 ppm généré par le groupement CH_2 en position 2 (Figure 38).



L'analyse des spectres RMN ^1H des échantillons issus d'une culture sur un mélange glucose plus acide valérique révèle la présence de signaux permettant de caractériser la présence d'un copolymère de poly[(3-hydroxybutyrate)-co-(3-hydroxyvalérate)] PHBV : deux signaux à 5,25 ($\text{CH}_{3\text{HB}}$) et 5,15 ppm ($\text{CH}_{3\text{HV}}$) correspondant respectivement aux protons des groupements CH des unités 3HV et 3HB. Le triplet à 0,88 ppm est attribué au groupe méthyle terminal de l'unité monomérique 3HV tandis que le doublet à 1,2 ppm correspond au CH_3 terminal du monomère 3HB ; le multiplet à 2,36-2,71 ppm est attribué aux deux protons méthyléniques (CH_2) situés sur l'atome 2 des monomères 3HB et 3HV. Enfin le signal sortant à 1,62 ppm correspond aux protons 3HV situés le carbone 4. L'intégration des signaux permet de quantifier les ratios de 85 mol% d'unités 3HB et de 15 mol% d'unités 3HV (Figure 39).



Les caractéristiques thermiques de ces deux PHA à courtes chaînes ont été étudiées par Analyse Enthalpique Différentielle : le PHB présente une température de fusion T_m de 174°C , une enthalpie de fusion (ΔH_f) de 109J.g^{-1} , et une température de transition vitreuse T_g non visible, ce qui caractérise un polymère cristallin. Quant au PHBV, il affiche une température de fusion T_m à 156°C , une enthalpie de fusion (ΔH_f) de 36 J.g^{-1} , et une température de transition vitreuse T_g de $-2,8^\circ\text{C}$, et caractérise ainsi un polymère semi-cristallin (Figure 40).

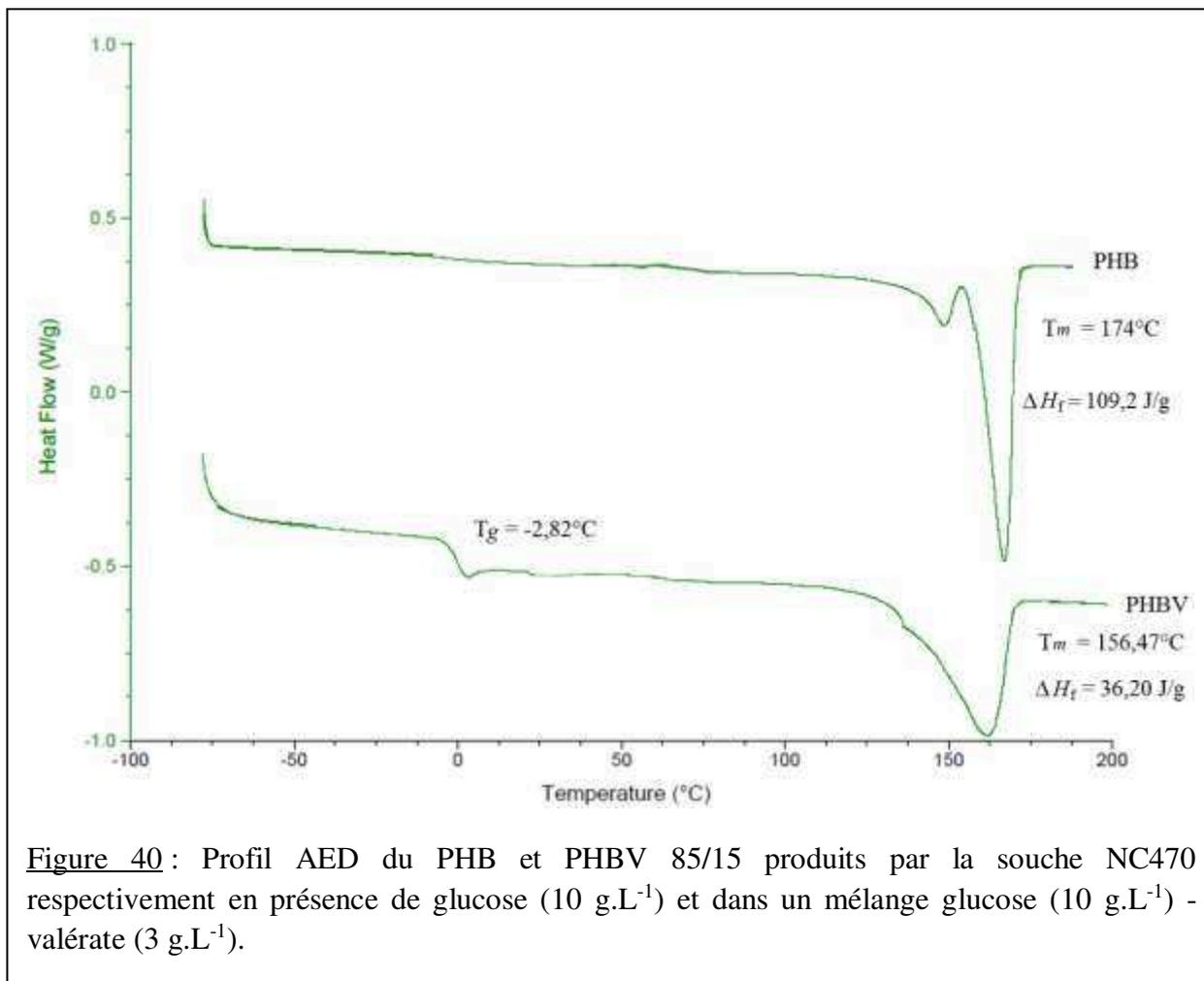


Figure 40 : Profil AED du PHB et PHBV 85/15 produits par la souche NC470 respectivement en présence de glucose (10 g.L^{-1}) et dans un mélange glucose (10 g.L^{-1}) - valérate (3 g.L^{-1}).

2) Les PHA à moyennes chaînes

La production de PHA mcl a été réalisée à l'aide de la souche **NC 532**, seule souche identifiée comme potentiellement productrice de PHA mcl. En se basant sur des études réalisées précédemment au laboratoire (Simon-Colin et al. 2012b) (Simon-Colin et al; 2012), trois substrats carbonés ont été testés pour la production des PHA par la souche NC532 : l'huile de coprah (10 g.L^{-1}) qui est un mélange d'acides gras saturés (50% d'acide dodécanoïque, 15% d'acide tétradécanoïque, 10% d'acide hexadécanoïque, 8% d'acide octanoïque, 8% d'acide décanoïque, 8% d'acide octadécénoïque), l'acide octanoïque (3 g.L^{-1}) et/ou l'acide 10-undécénoïque ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$). En raison de la toxicité et de la faible solubilité de l'acide octanoïque et de l'acide 10-undécénoïque, les concentrations mises en œuvre sont plus faibles que pour l'huile de coprah.

Après extraction et purification, le produit obtenu se présente sous la forme d'une gomme élastomérique plus ou moins malléable selon la nature de la source de carbone utilisée, avec un aspect légèrement visqueux pour le polymère produit à partir d'un mélange d'acide octanoïque (3 g.L^{-1}) plus acide 10-undécénoïque ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Les valeurs de rendements pour ces cultures sont présentées dans le [Tableau 21](#) :

Tableau 21 : Résultats de la production de PHA mcl par la souche NC532.

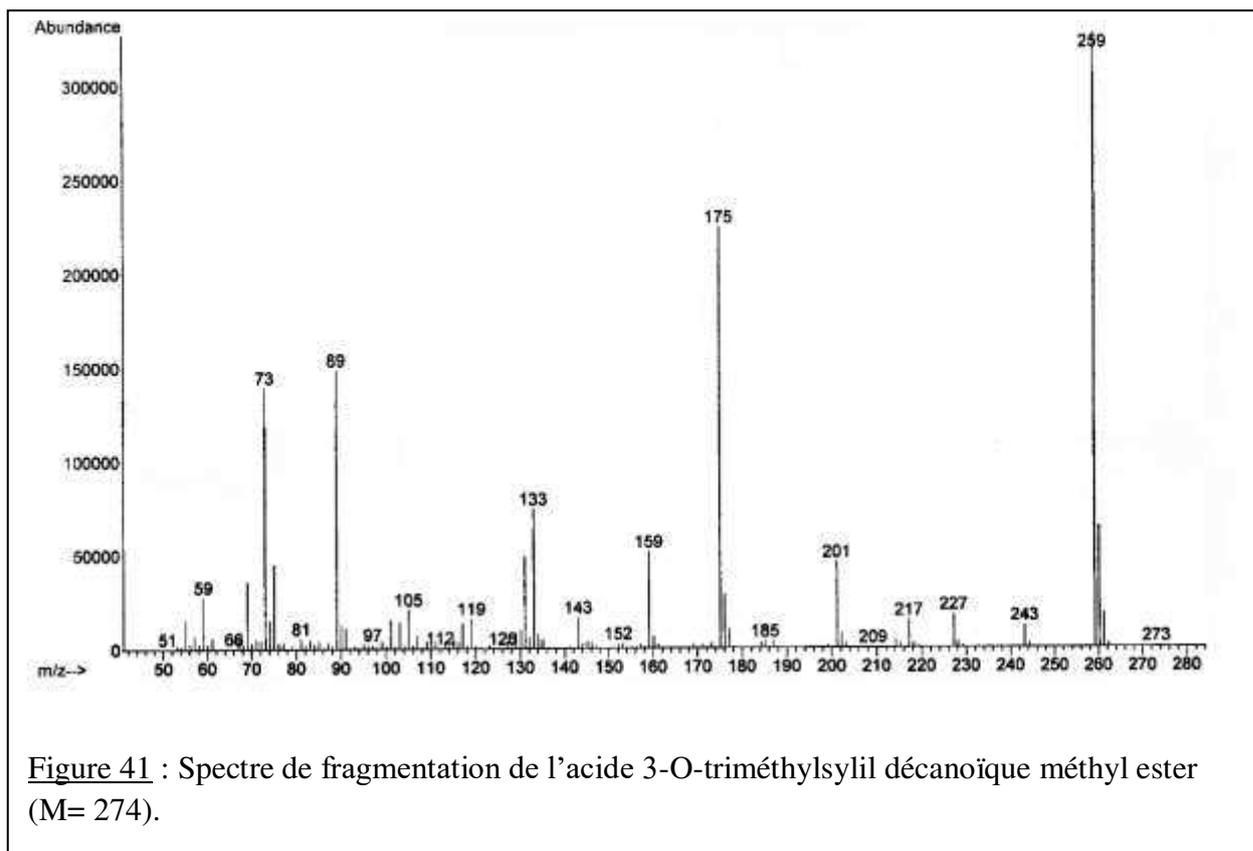
Source carbone	MCS (g)	Mextrait (g)	Rendement (% MCS)
Coprah 10 g.L^{-1}	9,52	3,7	38,8
Ac Oct 3 g.L^{-1}	7,2	1,8	25
Ac 10-Und $0,5 \text{ g.L}^{-1}$	5,4	0,43	8
Ac Oct 3 g.L^{-1} + Ac 10-Und $0,5 \text{ g.L}^{-1}$	4,9	0,124	2,5

MCS est la masse de cellules sèches obtenues après lyophilisation du culot bactérien, Mextrait est la masse de polymère purifié.

L'utilisation d'huile de coprah à 10 g.L^{-1} aboutit à un rendement de production de 38,8%, alors que les cultures sur acide octanoïque (3 g.L^{-1}) et/ou acide 10-undecénoïque ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) aboutissent à un rendement maximal de 25%, probablement en partie expliqué par la quantité limitée de substrat disponible.

La composition monomérique des PHA produits par la souche NC532 a été déterminée par CPG-SM et RMN.

Les spectres de masse des esters méthyliques triméthylsilylés des 3-hydroxyacides montrent des fragments caractéristiques à m/z 175 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+=\text{CHCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3]$ et m/z $[\text{M}-73]$ $[\text{RCH}=\text{O}^+\text{Si}(\text{CH}_3)_3]$ résultant du clivage en α du groupement hydroxyle triméthylsilylé (Figure 41). Les fragments à m/z $[\text{M}-15]$, $[\text{M}-31]$ et $[\text{M}-73]$ renseignent sur la longueur du squelette carboné de chaque monomère constitutif, l'ion moléculaire $[\text{M}]$ n'étant pas visible. Le fragment $[\text{M}-15]$ est utilisé pour déterminer la longueur de la chaîne carbonée (ex : 259 pour 3-hydroxydécanoate (3HD), 285 pour 3-hydroxydodécénoate (3HDDe). L'existence et le nombre de doubles liaisons sont déterminés d'après la valeur du fragment $[\text{M}-15]$, qui est réduite de $2xN$ amu par rapport à celle du monomère saturé (N correspondant au nombre d'insaturations). D'autres fragments communs aux acides 3-hydroxyalcanoïques sont également détectés : m/z 73 $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+]$, m/z 89 $[(\text{CH}_3)_3\text{SiO}^+]$, m/z 131 $(\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SiO}_2)^+$, m/z 159 $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{SiO}_3)^+$ et m/z 133 $(\text{C}_5\text{H}_{13}\text{SiO}_2)^+$ (Figure 41).



Les PHA produits par la souche NC532 sont des PHA mcl composés de 6 à 8 unités monomériques selon la nature du(des) substrat(s) carboné(s) : 3-hydroxyhexanoate (3HHx), 3-hydroxyhept-6-énoate (3HHp :1Δ6), 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxynon-8-énoate (3HN :1Δ8), 3-hydroxydécanoate (3HD), 3-hydroxyundéc-10-énoate, et dont les proportions varient selon les conditions de culture (Tableau 22). L'analyse de ces résultats montre que la nature du substrat influe sur la composition du PHA produit. Ainsi, les cellules cultivées en présence d'huile de coprah accumulent un PHA composé d'égales quantités de 3HO (31 mol%) et de 3HD (30 mol%), ainsi que des proportions significatives de 3HDD (16,5 mol%), 3HTD (13 mol%), et 3HTD :1 (7 mol%). De la même façon, le PHA produit à partir d'acide octanoïque est composé majoritairement de 3HO (92 mol%) et de faibles quantités en 3HD (5 mol%) et 3HHx (3 mol%). Enfin, le polyester obtenu à partir d'octanoate de sodium et d'acide 10-undécénoïque se caractérise par une composition dominée par le 3HO et la présence d'insaturations portées majoritairement par les unités 3HN:1Δ8 et 3HUD:1Δ10.

Cette structure correspond à celle du PHOU (poly(3-hydroxyoctanoate-co-3-hydroxyundécénoate)).

Tableau 22 : Compositions monomériques (mol%) déterminées par CPG-SM des PHA mcl produits par la souche NC532.

Source Carbone	Composition monomérique (mol%)								
	3HHx	3HHp:1Δ6	3HO	3HN:1Δ8	3HD	3HUD:1Δ10	3HDD	3HDD:1Δ5	% C=C
Coprah 10g.L ⁻¹	2,3		33,5		40,4		23,8		nd
Ac.Oct 3g.L ⁻¹	3		92		5				nd
Ac Oct 3g.L ⁻¹ + Ac 10-Und 0,5g.L ⁻¹	3	1.7	72	13.5	3.2	6	0.5	0.1	22,6

Abréviations utilisées : 3HHx (3-hydroxyhexanoate), 3HHp:1Δ6 (3-hydroxyhept-6-énoate), 3HO (3-hydroxyoctanoate), 3HN:1Δ8 (3-hydroxynon-8-énoate), 3HD (3-hydroxydecanoate), 3HUD:1Δ10 (3-hydroxyundec-10-énoate), 3HDD (3-hydroxydodecanoate), 3HDD:1Δ5 (3-hydroxydodec-5-énoate).

La position terminale de l'insaturation au sein des unités 3-hydroxyhept-6-énoate, 3-hydroxynon-8-énoate et 3-hydroxyundec-10-énoate a été déterminée sans ambiguïté par l'analyse des spectres de fragmentation en masse des dérivés 3-O-acétyl thiométhyl méthyl esters (Figure 42). Les spectres de masse des dérivés 3-O-acétyl thiométhyle méthyl esters montrent des fragments caractéristiques à m/z [M⁺] correspondant à l'ion moléculaire, et à m/z [A] et [B- HOAc] (issu du fragment [B] par perte du groupement O-Acétyl) qui sont issus de la rupture entre les deux groupements CH-SCH₃ c'est-à-dire au niveau de la double liaison. Ces trois fragments permettent de localiser simplement et sans ambiguïté la double liaison au sein des chaînes carbonées. Le fragment à m/z 61 correspond au groupement [⁺SCH₃].

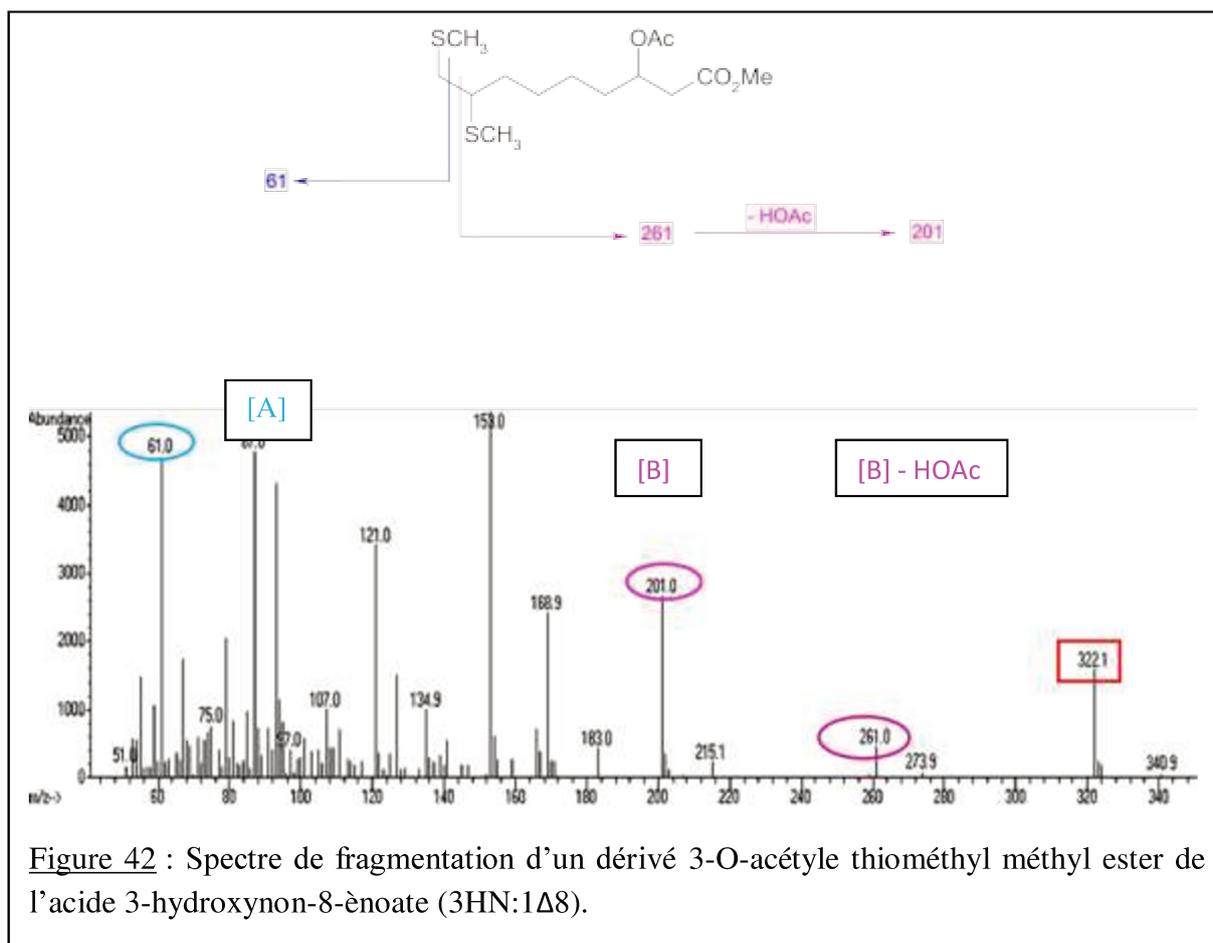


Figure 42 : Spectre de fragmentation d'un dérivé 3-O-acétyle thiométhyl méthyl ester de l'acide 3-hydroxynon-8-énoate (3HN:1Δ8).

L'analyse des spectres RMN ^1H des PHA produits par la souche NC532 confirme la présence de monomères à moyenne chaîne, ce qui permet de déterminer la présence et le pourcentage d'insaturations. Sur le spectre RMN ^1H d'un PHA mcl saturé, sont observés les signaux du proton du carbone 3 (CH) à 5,2 ppm, des protons du groupe méthyle terminal sous la forme d'un triplet à 0,9 ppm et les protons situés sur le carbone 2 sous la forme d'un multiplet à 2,47-2,60 ppm. Le signal des protons situés sur le carbone 4 se trouve à 1,6 ppm alors que le signal des autres protons de la chaîne latérale saturée se trouve à 1,3 ppm (Figure 43).

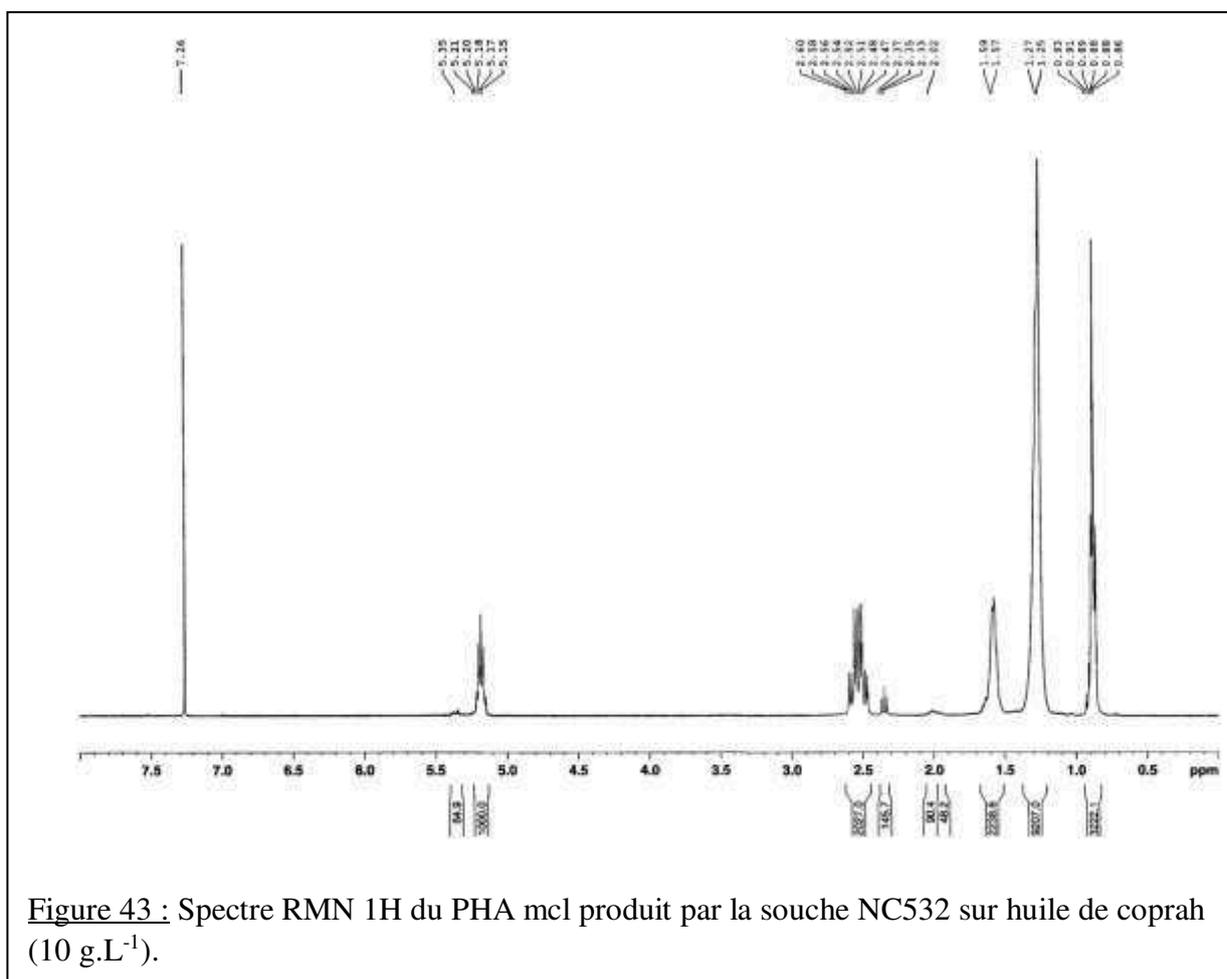


Figure 43 : Spectre RMN ^1H du PHA mcl produit par la souche NC532 sur huile de coprah (10 g.L^{-1}).

Sur les spectres des PHA mcl insaturés (spectre PHOU 23% NC532), la présence d'insaturations est matérialisée par l'apparition de nouveaux signaux dans la région des protons éthyléniques : le multiplet à 5,00 ppm est attribué aux protons h de la double liaison terminale ($H_2C=$) et le multiplet à 5,77 ppm au proton g de la double liaison ($=CH$), tandis que le multiplet à 2,1 ppm est attribué aux protons méthyléniques f et f' (Figure 44).

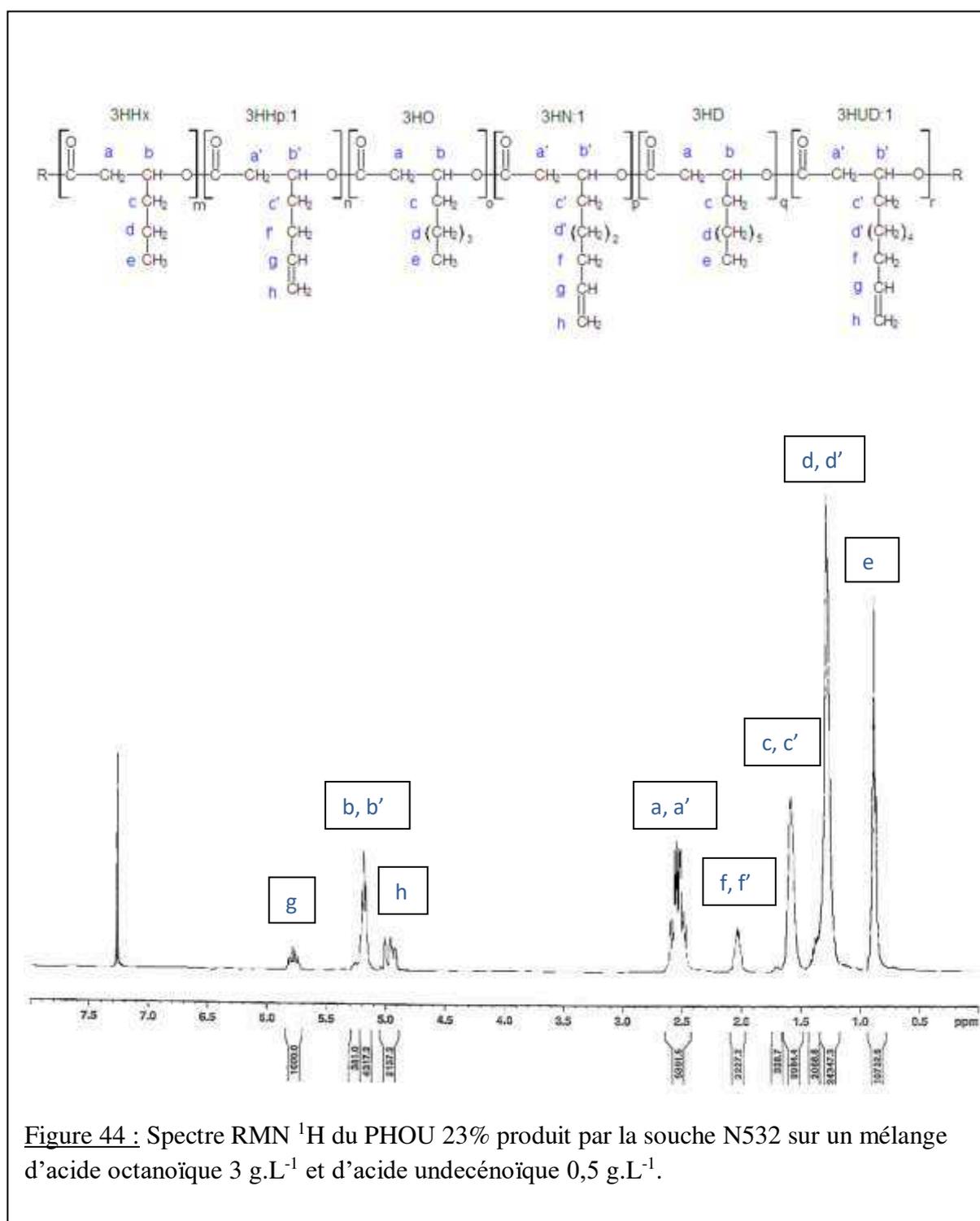


Figure 44 : Spectre RMN 1H du PHOU 23% produit par la souche N532 sur un mélange d'acide octanoïque 3 g.L $^{-1}$ et d'acide undécénoïque 0,5 g.L $^{-1}$.

Le taux d'insaturation est déterminé d'après le rapport des intégrations du signal proton du CH à 5,7 ppm (g) sur le signal du CH à 5,2 ppm (b, b'). Ce dernier a ainsi été estimé à 23% lorsque la souche NC532 est cultivée en présence de 3g.L^{-1} d'acide octanoïque complétement par $0,5\text{g.L}^{-1}$ d'acide 10-undecenoïque.

Les expériences en Analyse Enthalpique Différentielle (Figure 45) montrent le caractère semi cristallin à amorphe de ces trois PHA mcl dont les points de fusion T_m sont compris entre $48,6$ et 52°C , l'enthalpie de fusion (ΔH_f) entre 3 et $17,33\text{ J.g}^{-1}$, et la température de transition vitreuse T_g entre -41 et -44°C (Tableau 23).

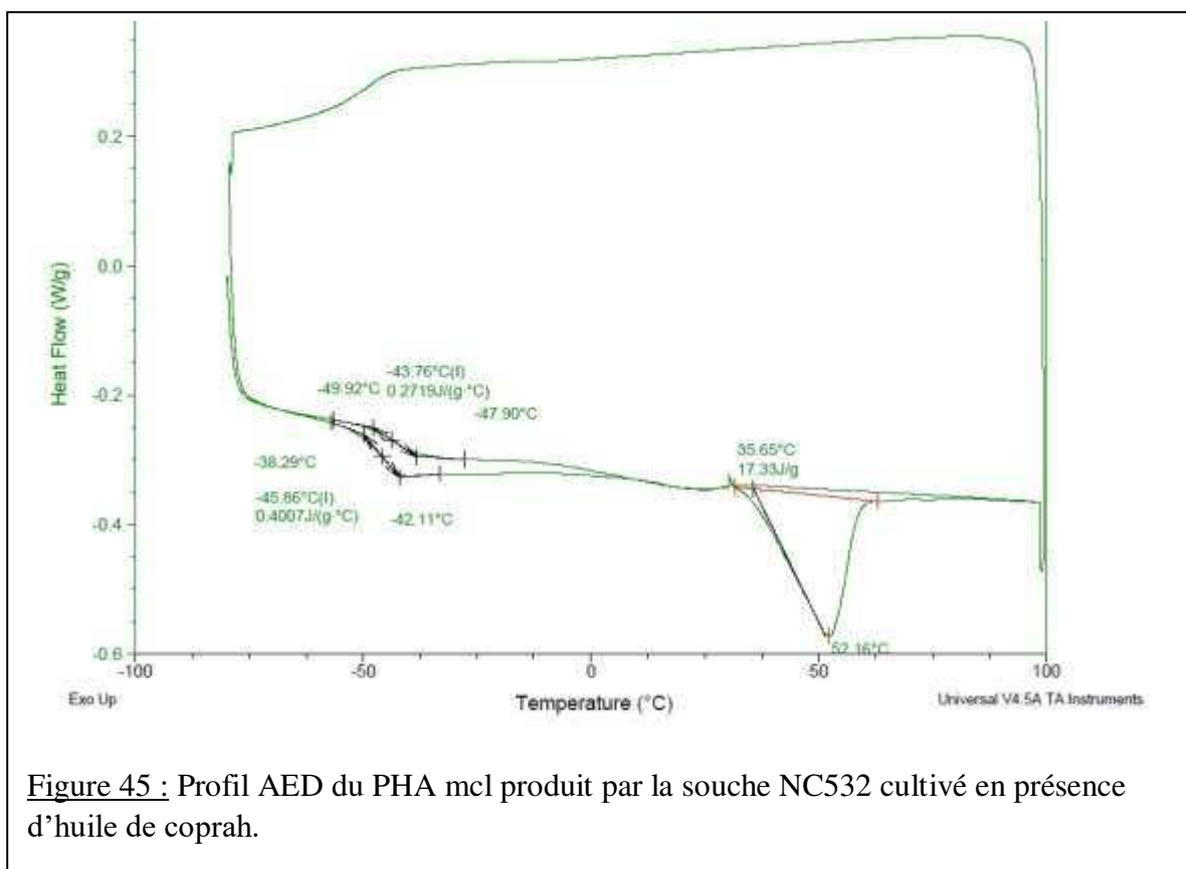


Figure 45 : Profil AED du PHA mcl produit par la souche NC532 cultivé en présence d'huile de coprah.

Tableau 23 : Température de fusion (T_m), de transition vitreuse (T_g) et enthalpie de fusion (ΔH_f) des PHA mcl produits par la souche NC532.

Source Carbone	T_m (°C)	ΔH_f (J/g)	T_g (°C)
Coprah 10g.L ⁻¹	52,16	17,33	-43,76
Ac Oct 3g/L ⁻¹	48,63	3	-40,96
Ac Oct 3g.L ⁻¹ +	49	6	-42
Ac 10-Und 0,5g.L ⁻¹			

III. Conclusion de la partie IV

Les travaux réalisés dans cette étude ont permis de mettre au point un protocole de criblage PCR fiable permettant la détection des bactéries productrices de PHA scl. Ce test PCR ainsi que celui permettant la détection des bactéries productrices de PHA mcl, ont été utilisés pour le criblage de la collection de souches bactériennes de Nouvelle-Calédonie. À l'issue de ce criblage, 11 souches ont été sélectionnées pour la production de PHA par fermentation bactérienne (NC532 pour la production de PHA mcl, et les souches NC14, NC15, NC21, NC23, NC282, NC283, NC470, NC493, NC615, NC617 pour la production de PHA scl).

La souche NC532 à été identifiée comme appartenant au genre *Pseudomonas*, mais les données obtenues n'ont pas permis de relier la souche à une espèce connue. Le genre *Pseudomonas* est connu pour la production de PHA mcl. Les travaux menés sur la souche NC532 ont permis de produire trois PHA mcl de structures différentes, à chaînes carbonées saturées ou insaturées, selon la nature du substrat carboné fourni. En particulier, la synthèse de PHOU qui porte une double liaison en position terminale est intéressante, car elle permet d'envisager des réactions de modifications chimiques permettant de changer et/ou améliorer les propriétés de ces polymères, ou encore de greffer d'autres molécules. Ces modifications pourraient notamment ouvrir la voie vers des applications dans le domaine biomédical.

Parmi les souches productrices de PHA scl, la souche NC470 s'est démarquée avec un rendement de production en PHB plus élevé que les autres souches pour une synthèse à partir du glucose (10 g.L^{-1}). En outre, l'ajout d'acide valérique (3 g.L^{-1}) dans le milieu de culture se traduit par la synthèse d'un copolymère de PHBV 85%3HB/15%3HV dont l'intérêt biotechnologique est lié à ses propriétés thermiques et mécaniques compatibles avec les conditions de mise en œuvre de l'industrie.

Conclusion générale et perspectives

I. Les polymères marins de Nouvelle-Calédonie

L'exploration des milieux intertidaux atypiques de la Nouvelle-Calédonie a permis la création d'une collection de micro-organismes riche de 771 isolats. L'étude présentée dans ce manuscrit se situe dans un cadre prospectif ayant pour objectif d'évaluer le potentiel biotechnologique d'isolats bactériens et des molécules qui en sont issues. Les recherches menées dans le cadre de cette thèse ont permis, d'une part d'identifier un grand nombre d'isolats, et d'autre part de caractériser d'un point de vue physico-chimique les polymères bactériens produits (EPS et PHA), permettant d'envisager des premières pistes de valorisation biotechnologique.

A. Les EPS

Concernant les EPS, nous avons partiellement caractérisé 10 polymères. Plusieurs axes de valorisation peuvent d'ores et déjà être envisagés, en se basant sur la composition chimique globale de ces EPS et leur analogie structurale par rapport à d'autres polymères décrits dans la littérature et/ou déjà utilisés dans certaines applications.

- Les EPS produits par les souches NC275, NC336, NC470, NC490 et NC493 sont majoritairement composés d'hexosamines et d'acides uroniques, présentant une structure proche de celle des GAG (glycosaminoglycanes) comme les hyaluronanes employés en cosmétique pour leurs propriétés antirides et cicatrisantes. Les hyaluronanes sont également utilisés dans le secteur de la santé avec des applications médicales notamment en chirurgie ophtalmique, articulaire et réparatrice.
- La souche NC615, identifiée comme appartenant au genre *Rugeria*, produit un EPS composé essentiellement de N-acétyl-galactosamine et de faibles quantités d'oses neutres tels que le glucose et le mannose. A ce jour, aucune donnée portant sur l'étude des EPS produits par des souches appartenant au genre *Rugeria* n'est disponible dans la littérature. La description de cette souche NC615 *Rugeria* sp. comme productrice d'EPS constitue un des premiers résultats originaux de cette étude doctorale. L'originalité de cet EPS riche N-acétyl-galactosamine pourrait trouver des pistes de valorisation dans le

secteur de la santé. Une étude portant sur l'utilisation de liposomes (vésicule lipidique artificielle utilisée comme transporteur pour certains principes actifs) a montré que le couplage à des polymères N-acétyl-galactosilés permettait d'accroître la spécificité de ces structures pour certains sites de transport (Wu et al. 2002). Une perspective de valorisation dans le secteur de la santé pourrait être imaginée pour ce type de polymère.

- L'étude portant sur la capacité de rétention des cations métalliques tels que le cuivre et le nickel, a fourni des premiers résultats tout à fait encourageants avec des capacités de rétention estimées à 357 mg.g⁻¹ d'EPS pour le Cu 114,19 mg.g⁻¹ d'EPS pour le Nickel par l'échantillon NC470. Bien que cette étude n'ait été réalisée que sur quatre échantillons, les expériences semblent confirmer que la présence d'acides uroniques dans les EPS favorise le phénomène de chélation. Ainsi les échantillons NC359 et NC470 peuvent être considérés comme de bons candidats pour la chélation des cations métalliques. Dans le contexte Néo-Calédonien, l'utilisation de polymères captant efficacement les métaux en solution constitue une perspective de développement intéressante au niveau local, avec pour cible privilégiée, le secteur minier. Des discussions sont en cours avec des industriels pour développer un projet de recherche portant sur la bioremédiation des métaux.
- Quant aux EPS NC282 et NC393, majoritairement composés d'oses neutres, leur production pourrait intéresser le secteur de l'agroalimentaire en tant qu'agent de texture ou encore comme agent cryoprotecteur permettant une meilleure conservation des produits. Dans cette perspective, des études seraient à mener sur les propriétés rhéologiques de ces deux biopolymères.

B. Les PHA

L'étude sur les PHA a débuté par la mise en place de deux méthodes de criblage par PCR. La première permettant la détection des bactéries capables de produire des PHA scl et la seconde spécifique des PHA mcl. Ces méthodes sont basées sur la reconnaissance et l'amplification d'un gène spécifique codant pour la synthèse d'une enzyme clé : la PHA synthase (Lee 1996; Sheu et al. 2000; Solaiman et al. 2000; Chen 2010). Cette enzyme n'intervenant qu'en fin de voie de biosynthèse des PHA, elle n'est encodée que par un gène ce qui la rend aisément détectable par biologie moléculaire. Le développement de ces tests PCR constitue une avancée majeure dans la recherche de bactéries productrices de PHA, car il permet de se soustraire au test de criblage phénotypique, long, fastidieux et peu fiable. Même si ce test par PCR présente quelques limites liées au fait que certaines souches possèdent le gène sans l'exprimer, le criblage par biologie moléculaire reste, à ce jour, la méthode la plus simple et la plus fiable. Le test de criblage développé au cours de travail de thèse pour cibler les souches potentiellement productrices de PHA a montré son efficacité sur plusieurs genres bactériens (*Vibrio*, *Salinivibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas* et *Ruegeria*) et a permis de mettre en évidence, au sein de la collection de bactéries marines de Nouvelle-Calédonie, un nombre conséquent de souches bactériennes potentiellement productrices de PHA.

Les expériences de fermentation en milieu liquide ont été réalisées sur quelques souches sélectionnées à l'issue du criblage par PCR. Plusieurs PHA appartenant à la catégorie de PHA à courte et à moyenne chaînes, ont ainsi été produits, en agissant sur la nature de la source de carbone et/ou le microorganisme producteur.

Parmi les souches productrices de PHA scl, la souche NC470 s'est révélée être la plus intéressante, avec un rendement de production atteignant $1,2\text{g PHB.L}^{-1}$ lorsque le substrat carboné est du glucose à 10g/L . En outre, l'ajout d'acide valérique (3g.L^{-1}) dans le milieu de culture aboutit à la synthèse d'un copolymère de PHBV $85\%3\text{HB}/15\%3\text{HV}$ dont l'intérêt biotechnologique est lié à ses propriétés thermiques et mécaniques compatibles avec les conditions de mise en œuvre de l'industrie (Avella et al. 2000). En sus de ces propriétés physiques, le caractère biodégradable et biocompatible de ces polyesters ouvrent des

perspective intéressantes dans le secteur de la santé pour des applications médicales (Köse et al. 2003; Sevastianov et al. 2003; Köse et al. 2005) et pharmaceutiques (Sendil et al. 1999).

En ce qui concerne les bactéries productrices de PHA mcl, seule une souche, notée NC532 a été identifiée à l'issue du criblage PCR. L'étude phylogénétique partielle (analyse de la sous unité ribosomique 16S), menée sur cette souche a permis de la classer dans le genre *Pseudomonas* et n'a pas permis, à ce jour, de relier cette souche à une espèce connue.

A partir de la souche NC532, nous avons pu produire un PHA mcl à partir d'huile coprah comme unique source de carbone. Cet élastomère présente une composition proche de celle du PHA produit par la souche *Pseudomonas guezennei* biovar tikehau issue des prospections en Polynésie Française (Simon-Colin et al. 2008b) : une composition dominée par les monomères saturés de 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxydecanoate (3HD) et 3-hydroxydodecanoate (3HDD). L'utilisation d'acide octanoïque en mélange avec de l'acide-10-undecenoïque a abouti à la production d'un PHOU, PHA mcl composé majoritairement de 3-hydroxyoctanoate 3HO et la présence d'insaturations en position terminale portées majoritairement par les unités 3-hydroxy-8-nonenoate (3HN:1 Δ 8) et 3-hydroxy-10-undecenoate (3HUD:1 Δ 10). La présence d'insaturations le long des chaînes carbonées des PHA, en particulier en position terminale, est très intéressante car elle permet d'envisager des réactions de modifications chimiques sur ce polymère. Ces modifications chimiques peuvent être réalisées pour différentes raisons, modifier/améliorer les propriétés du polymère natif, le greffer à d'autres molécules...mais intéressent plus particulièrement le domaine biomédical et notamment la libération contrôlée de médicaments (Renard et al. 2003; Renard et al. 2005; Lemechko et al. 2012b). Récemment, des copolymères amphiphiles associant PHA et EPS ont ainsi été élaborés avec une perspective d'utilisation dans le secteur biomédical (Lemechko et al. 2012a).

II. Autres perspectives de valorisation: le cas des antibiotiques

Au cours de ces dernières années, plusieurs centaines de molécules antimicrobiennes issues du milieu marin ont été identifiées (Williams 2009). Les bactéries marines sont par ailleurs considérées comme ayant un fort potentiel en matière de synthèse de molécules antibiotiques (Berdy 2005; Wilson et al. 2011). D'autre part, il est admis que les environnements extrêmes se retrouvent souvent associés à des bactéries productrices de métabolites intéressants, synthétisés en réponse aux conditions environnementales hostiles. Parmi ces métabolites, les molécules antibiotiques (de Carvalho and Fernandes 2010) présentent un intérêt majeur comme une nouvelle source d'agents antimicrobiens pour lutter contre les phénomènes croissants de résistances bactériennes (Moellering Jr 2011).

Le but de cette étude était de mettre en évidence l'activité antimicrobienne de certaines souches issues de la première campagne de prospection des milieux atypiques de la Nouvelle-Calédonie (493 isolats). Les souches ont été testées au moyen d'un criblage visant à mettre en évidence une activité antibactérienne sur des souches pathogéniques de référence (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis*). Sur les 493 isolats testés, 63 (12,8% de la collection) ont montré une activité antibiotique et 10 de ces 63 isolats ont ensuite été retenus pour des études plus approfondies. Les 10 souches présentant la plus forte activité inhibitrice ont été mises en culture. Le surnageant et les culots bactériens issus de ces cultures ont été fractionnés (ASE et Flash-chromatographie) puis retestés afin de vérifier le maintien de l'activité antibiotique. Finalement, 4 isolats (NC210, NC272, NC282 et NC412) ont montré une efficacité contre des souches multi résistantes.

Ce travail est décrit dans l'article suivant : Isolation and partial characterization of bacteria (*Pseudoalteromonas* sp.) with potential antibacterial activity from a marine coastal environment from New Caledonia, publié dans *Letters in Applied Microbiology*.

Les possibilités de valorisation des bactéries de Nouvelle-Calédonie ne se limitent donc pas à la seule thématique des biopolymères, et d'autres études autour des antibiotiques ou encore des pigments, acides organiques méritent d'être menés.

Les études menées tout au long de cette thèse confirment les observations faites sur d'autres écosystèmes atypiques quant à la détermination de bactéries capables de produire des polymères d'intérêt industriel. Au regard des résultats obtenus, les biotopes intertidaux de Nouvelle-Calédonie se présentent comme une formidable source de micro-organismes d'intérêt biotechnologique. Le développement croissant des méthodes de production associé à l'innovation technologique et aux découvertes de ces dernières années, assurent un avenir prometteur aux filières de valorisation marine et ceci dans un respect de l'intégrité des écosystèmes. Dans ce cadre-là, on ne parle plus de la mer comme un milieu d'exploitation, mais comme une source d'inspiration et d'innovations qui permettra d'allier la préservation de l'environnement au développement industriel. La mise en place de collections de micro-organismes constitue une source et un support pour la recherche, mais également un élan au développement économique. Les prospections menées jusqu'à présent ne donnent qu'un bref aperçu de la richesse des biotopes marins de Nouvelle-Calédonie, et de nombreux milieux restent encore à explorer. La Nouvelle-Calédonie se présente donc comme un formidable gisement de micro-organismes d'intérêt biotechnologique et il ne fait aucun doute que ce secteur participera au développement culturel et économique du territoire. Les biotechnologies s'inscrivent dans un principe de développement durable, qui passe par l'étude et la préservation du milieu marin. Mais de nombreuses études restent à réaliser afin de pérenniser cette filière tout en gardant à l'esprit que les recherches d'aujourd'hui constitueront les richesses de demain.

Bibliographie

Akita, S., Einaga, Y., Miyaki, Y. and Fujita, H. (1976) Solution Properties of Poly(D- β -hydroxybutyrate). *Biosynthesis and Characterization. Macromolecules* **9**, 774-780.

Amara, A.A. and Rehm, B.H.A. (2003) Replacement of the catalytic nucleophile cysteine-296 by serine in class II polyhydroxyalkanoate synthase from *Pseudomonas aeruginosa*-mediated synthesis of a new polyester: identification of catalytic residues. *Biochem J* **374**, 413-421.

Ambrose, S.H., Butler, B.M., Hanson, D.B., Hunter-Anderson, R.L. and Krueger, H.W. (1997) Stable isotopic analysis of human diet in the Marianas Archipelago, Western Pacific. *American Journal of Physical Anthropology* **104**, 343-361.

Anderson, A.J. and Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* **54**, 450-472.

Arias, S., Moral, A., Ferrer, M., Tallon, R., Quesada, E. and Béjar, V. (2003) Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. *Extremophiles* **7**, 319-326.

Arun, A., Arthi, R., Shanmugabalaji, V. and Eyini, M. (2009) Microbial production of poly- β -hydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. *Bioresource Technology* **100**, 2320-2323.

Ascher, B., Cerceau, M., Baspeyras, M. and Rossi, B. (2004) Les compléments par l'acide hyaluronique. *Annales de Chirurgie Plastique Esthétique* **49**, 465-485.

Asthana, R.K., Chatterjee, S. and Singh, S.P. (1995) Investigations on nickel biosorption and its remobilization. *Process Biochemistry* **30**, 729-734.

Avella, M., Martuscelli, E. and Raimo, M. (2000) Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. *Journal of Materials Science* **35**, 523-545.

Averbeck, M., Gebhardt, C.A., Voigt, S., Beilharz, S., Anderegg, U., Termeer, C.C., Sleeman, J.P. and Simon, J.C. (2006) Differential Regulation of Hyaluronan Metabolism in the Epidermal and Dermal Compartments of Human Skin by UVB Irradiation. *J Invest Dermatol* **127**, 687-697.

Babinot, J., Renard, E. and Langlois, V. (2010) Preparation of Clickable Poly(3-hydroxyalkanoate)(PHA): Application to Poly(ethylene glycol)(PEG) Graft Copolymers Synthesis. *Macromolecular rapid communications* **31**, 619-624.

Badel, S., Bernardi, T. and Michaud, P. (2011) New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* **29**, 54-66.

Balasse, M., Tresset, A. and Ambrose, S.H. (2006) Stable isotope evidence ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$) for winter feeding on seaweed by Neolithic sheep of Scotland. *Journal of Zoology* **270**, 170-176.

Ballard, D.G.H., Holmes, P.A. and Senior, P.J. (1987) Formation of Polymers of β -Hydroxybutyric Acid in Bacterial Cells and a Comparison of the Morphology of Growth with the Formation of Polyethylene in the Solid State. In *Recent Advances in Mechanistic and Synthetic Aspects of Polymerization* eds. Fontanille, M. and Guyot, A. pp.293-314: Springer Netherlands.

Barbuzzi, T., Giuffrida, M., Impallomeni, G., Carnazza, S., Ferreri, A., Guglielmino, S.P.P. and Ballistreri, A. (2004) Microbial Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from Fatty Acids: Identification of Higher Monomer Units and Structural Characterization. *Biomacromolecules* **5**, 2469-2478.

Barnard, G.N. and Sanders, J.K. (1989) The poly-beta-hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 3286-3291.

Bassett, D.C. and Holmes, P.A. (1988) Biologically Produced (R)-3-Hydroxy- Alkanoate Polymers and Copolymers. In *Developments in Crystalline Polymers*. pp.1-65: Springer Netherlands.

Bear, M.-M., Leboucher-Durand, M.-A., Langlois, V., Lenz, R.W., Goodwin, S. and Guérin, P. (1997) Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxy groups in the side chains. *Reactive and Functional Polymers* **34**, 65-77.

Bear, M.-M., Renard, E., Randriamahefa, S., Langlois, V. and Guérin, P. (2001) Preparation of a bacterial polyester with carboxy groups in side chains. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry* **4**, 289-293.

Beech, I. and Tapper, R. (1999) Exopolymers of Sulphate-Reducing Bacteria. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances* eds. Wingender, J., Neu, T. and Flemming, H.-C. pp.119-126: Springer Berlin Heidelberg.

Belcher, R., Nutten, A.J. and Sambrook, C.M. (1954) The determination of glucosamine. *Analyst* **79**, 201-208.

Beolchini, F., Pagnanelli, F., Toro, L. and Vegliò, F. (2006) Ionic strength effect on copper biosorption by *Sphaerotilus natans*: equilibrium study and dynamic modelling in membrane reactor. *Water Research* **40**, 144-152.

Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites. *The Journal of antibiotics* **58**, 1-26.

Bhaskar, P.V. and Bhosle, N.B. (2006) Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment International* **32**, 191-198.

Bitton, G. and Freihofner, V. (1977) Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*. *Microbial Ecology* **4**, 119-125.

Bleau, C., Monges, A., Rashidan, K., Laverdure, J.P., Lacroix, M., Van Calsteren, M.R., Millette, M., Savard, R. and Lamontagne, L. (2010) Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 666-675.

Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry* **54**, 484-489.

Blunt, W., J., Copp, R., B., Munro, G., M.H., Northcote, T., P., Princep and R., M. (2006) Marine natural products. *Natural Product Reports* **23**, 53.

Boroujerdi, A.F.B., Jones, S.S. and Bearden, D.W. (2012) NMR analysis of metabolic responses to extreme conditions of the temperature-dependent coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *Letters in Applied Microbiology* **54**, 209-216.

Boulnois, G.J. and Jann, K. (1989) Bacterial polysaccharide capsule synthesis, export and evolution of structural diversity. *Molecular Microbiology* **3**, 1819-1823.

Boyandin, A.N., Kalacheva, G.S., Rodicheva, E.K. and Volova, T.G. (2007) Luminous bacteria as potential producers of resorbed polyhydroxyalkanoate polyesters. *Dokl Biochemistry and Biophysics* **416**, 248-251.

Bramhachari, P.V. and Dubey, S.K. (2006) Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 571-577.

Bramhachari, P.V., Kavi Kishor, P.B., Kumar, R., Rama Rao, B. and Dubey, S.K. (2007) Isolation and Characterization of Mucous Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Vibrio furnissii* Strain VB0S3. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 44-51.

Brock, T., Brock, K., Belly, R. and Weiss, R. (1972) *Sulfolobus*: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Archiv Mikrobiol* **84**, 54-68.

Brown, A.J. (1886) On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society* **49**, 432-439.

Brown, M.J. and Lester, J.N. (1979) Metal removal in activated sludge: the role of bacterial extracellular polymers. *Water Research* **13**, 817-837.

Brown, R.E., Jarvis, K.L. and Hyland, K.J. (1989) Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Analytical Biochemistry* **180**, 136-139.

Brzostowicz, P., Blasko, M. and Rouvière, P. (2002) Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 781-789.

Byrom, D. (1987) Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology* **5**, 246-250.

Cescutti, P. (2009) Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides. In *Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications* ed. Anthony P Moran, O.H., Patrick Brennan, Mark von Itzstein. pp.93-108. London UK.

Cescutti, P., Cuzzi, B., Liut, G., Segonds, C., Di Bonaventura, G. and Rizzo, R. (2011) A novel highly charged exopolysaccharide produced by two strains of *Stenotrophomonas maltophilia* recovered from patients with cystic fibrosis. *Carbohydrate Research* **346**, 1916-1923.

Cevallos, M.A., Encarnación, S., Leija, A., Mora, Y. and Mora, J. (1996) Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* **178**, 1646-1654.

Chalkiadakis, E., Dufourcq, R., Schmitt, S., Brandily, C., Kervarec, N., Coatanea, D., Amir, H., Loubersac, L., Chanteau, S., Guezennec, J., Dupont-Rouzeyrol, M. and Simon-Colin, C. (2013) Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov., from New Caledonia. *Journal of Applied Microbiology*, n/a-n/a.

Chang, J.-S., Law, R. and Chang, C.-C. (1997) Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research* **31**, 1651-1658.

Chaplin, M.F. (1986) *Carbohydrate Analysis. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford.

Chelikani, P., Fita, I. and Loewen, P.C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 192-208.

Chen, G.-Q. (2010) Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. In *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications* ed. Springer-Verlag. pp.17-37. Berlin: Microbiology Monographs.

Chen, G.G.-Q. and Chen, G.-Q. (2010) Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. In *Plastics from Bacteria*. pp.17-37: Springer Berlin Heidelberg.

Chien, C.-C., Chen, C.-C., Choi, M.-H., Kung, S.-S. and Wei, Y.-H. (2007) Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology* **132**, 259-263.

Chong, B., Blank, L., McLaughlin, R. and Nielsen, L. (2005) Microbial hyaluronic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**, 341-351.

Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T. and Klimiuk, E. (2006) Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 190-199.

Colegrove, G.T. (1983) Agricultural applications of microbial polysaccharides. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* **22**, 456-460.

Coleman, I. and Patrick, W. (2012) Juvéderm® family. *Soft Tissue Augmentation: Procedures in Cosmetic Dermatology Series*, 17.

Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Sinquin, C., Fischer, A.M. and Guezennec, J. (2004) Microbial polysaccharides of marine origin and their potential in human therapeutics. *Pathologie-biologie* **52**, 127-130.

Collic Jouault, S., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Sinquin, C., Roger, O. and Fischer, A.-M. (2001) Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1528**, 141-151.

Conti, E., Flaibani, A., O'Regan, M. and Sutherland, I.W. (1994) Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: Production and properties. *Microbiology* **140**.

Costa, R., Mermoud, I., Koblavi, S., Morlet, B., Haffner, P., Berthe, F., Legroumellec, M. and Grimont, P. (1998) Isolation and characterization of bacteria associated with a *Penaeus stylirostris* disease (Syndrome 93) in New Caledonia. *Aquaculture* **164**, 297-309.

Craigie, J. (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology* **23**, 371-393.

Crist, R.H., Martin, J.R., Carr, D., Watson, J.R. and Clarke, H.J. (1994) Interaction of Metals and Protons with Algae. Ion Exchange vs Adsorption Models and a Reassessment of Scatchard Plots; Ion-Exchange Rates and Equilibria Compared with Calcium Alginate. *Environmental Science & Technology* **28**, 1859-1866.

Davidson, B.S. (1995) New dimensions in natural products research: cultured marine microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 284-291.

Dawes, E.A. and Senior, P.J. (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Advances in Microbial Physiology* **10**, 135-266.

de Carvalho, C. and Fernandes, P. (2010) Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment. pp.705-727.

de Nys, R. and Steinberg, P.D. (2002) Linking marine biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 244-248.

de Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J. and Wynberg, H. (1983) Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal of Bacteriology* **154**, 870-878.

Decho, A.W. (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* ed. Barnes, M. pp.73-153. Aberdeen, UK: Aberdeen Univ Press.

Decho, A.W. and Herndl, G.J. (1995) Microbial activities and the transformation of organic matter within mucilaginous material. *Science of the Total Environment* **165**, 33-42.

Deming, J.W. (1998) Deep ocean environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 283-287.

Deschatre, M., Ghillebaert, F., Guezennec, J. and Colin, C.S. (2013) Sorption of Copper(II) and Silver(I) by Four Bacterial Exopolysaccharides. *Appl Biochem Biotechnol*, 1-15.

Dias, J.M.L., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M.G.E., Ramos, A.M., Oliveira, R. and Reis, M.A.M. (2006) Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product. *Macromolecular Bioscience* **6**, 885-906.

Diels, L., Smet, M., Hooyberghs, L. and Corbisier, P. (1999) Heavy metals bioremediation of soil. *Mol Biotechnol* **12**, 149-158.

Diels, L., van Roy, S., Somers, K., Willems, I., Doyen, W., Mergeay, M., Springael, D. and Leysen, R. (1995) The use of bacteria immobilized in tubular membrane reactors for heavy metal recovery and degradation of chlorinated aromatics. *Journal of Membrane Science* **100**, 249-258.

Divyashree, M.S., Rastogi, N.K. and Shamala, T.R. (2009) A simple kinetic model for growth and biosynthesis of polyhydroxyalkanoate in *Bacillus flexus*. *New biotechnology* **26**, 92-98.

Doi, Y. (1990) *Microbial Polyesters*. New York.

Doi, Y. (1995) *Plastics from microbes. Microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Edited by D. P. Mobley, Hanser, Munich 1994, hardcover, 288 pp. DM 128.00, ISBN 3-446-17367-6. *Advanced Materials* **7**, 1046-1046.

Donia, M. and Hamann, M.T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases* **3**, 338-348.

Donlan, R.M. and Costerton, J.W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**, 167-193.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry* **28**, 350-356.

Dubreucq, G., Domon, B. and Fournet, B. (1996) Structure determination of a novel uronic acid residue isolated from the exopolysaccharide produced by a bacterium originating from deep sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Research* **290**, 175-181.

Duvernoy, O., Malm, T., Ramström, J. and Bowald, S. (1995) A Biodegradable Patch used as a Pericardial Substitute after Cardiac Surgery: 6- and 24-Month Evaluation with CT. *Thorac cardiovasc Surg* **43**, 271-274.

Enos-Berlage, J.L. and McCarter, L.L. (2000) Relation of Capsular Polysaccharide Production and Colonial Cell Organization to Colony Morphology in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* **182**, 5513-5520.

Ereky, K. (1919) *Biotechnologie der Fleisch-, Fett-, und Milcherzeugung im landwirtschaftlichen Grossbetriebe: für naturwissenschaftlich gebildete Landwirte verfasst*. Berlin: P. Parey.

Esposito, A., Pagnanelli, F. and Vegliò, F. (2002) pH-related equilibria models for biosorption in single metal systems. *Chemical Engineering Science* **57**, 307-313.

Fári, M.G. and Kralovánszky, U.P. (2006) The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science* **12**, 9-12.

Fialho, A., Moreira, L., Granja, A., Popescu, A., Hoffmann, K. and Sá-Correia, I. (2008) Occurrence, production, and applications of gellan: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **79**, 889-900.

Filisetti-Cozzi, T.M.C.C. and Carpita, N.C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry* **197**, 157-162.

Flemming, H.-C. and Wingender, J. (2002) Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. In *Encyclopedia of environmental microbiology* ed. Bitton, I.G. pp.1223-1231. New York: Wiley.

Foster, L.J.R., Moy, Y.P. and Rogers, P.L. (2000) Metal binding capabilities of *Rhizobium etli* and its extracellular polymeric substances. *Biotechnology Letters* **22**, 1757-1760.

Fourest, E. and Volesky, B. (1997) Alginate Properties and Heavy Metal Biosorption by Marine Algae. *Appl Biochem Biotechnol* **67**, 215-226.

Freese, E. (1962) On the evolution of the base composition of DNA. *Journal of Theoretical Biology* **3**, 82-101.

Freitas, A.C., Rodrigues, D., Rocha-Santos, T.A.P., Gomes, A.M.P. and Duarte, A.C. (2012) Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnology Advances* **30**, 1506-1515.

Fukui, T. and Doi, Y. (1997) Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *Journal of Bacteriology* **179**, 4821-4830.

Gabr, R.M., Hassan, S.H.A. and Shoreit, A.A.M. (2008) Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. *International Biodeterioration & Biodegradation* **62**, 195-203.

Gagnon, K.D., Lenz, R.W., Farris, R.J. and Fuller, R.C. (1992) The Mechanical Properties of a Thermoplastic Elastomer Produced by the Bacterium *Pseudomonas oleovorans*. *Rubber Chemistry and Technology* **65**, 761-777.

Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer applications in the biosciences : CABIOS* **12**, 543-548.

Gao, F., Yang, C.X., Mo, W., Liu, Y.W. and He, Y.Q. (2008) Hyaluronan oligosaccharides are potential stimulators to angiogenesis via RHAMM mediated signal pathway in wound healing. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* **31**, E106-116.

García-Ochoa, F., Santos, V.E., Casas, J.A. and Gómez, E. (2000) Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* **18**, 549-579.

Garg, H. and Hales, C. (2004) Viscoelastic Properties of Hyaluronan and Its Therapeutic Use. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, 415.

Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology--a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances* **23**, 471-499.

Ghormade, V., Deshpande, M.V. and Paknikar, K.M. (2011) Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. *Biotechnology Advances* **29**, 792-803.

Goarant, C., Ansquer, D., Herlin, J., Domalain, D., Imbert, F. and De Decker, S. (2006) "Summer Syndrome" in *Litopenaeus stylirostris* in New Caledonia: Pathology and epidemiology of the etiological agent, *Vibrio nigripulchritudo*. *Aquaculture* **253**, 105-113.

Goarant, C., Reynaud, Y., Ansquer, D., de Decker, S. and Merien, F. (2007) Sequence polymorphism-based identification and quantification of *Vibrio nigrripulchritudo* at the species and subspecies level targeting an emerging pathogen for cultured shrimp in New Caledonia. *Journal of Microbiological Methods* **70**, 30-38.

Gonzalez, J.M. and Saiz-Jimenez, C. (2002) A fluorimetric method for the estimation of G+C mol% content in microorganisms by thermal denaturation temperature. *Environmental Microbiology* **4**, 770-773.

Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A. and Rehm, B.H.A. (2009) Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **10**, 660-669.

Gross R.A, DeMello C, Lenz R.W, Brandl H and Fuller R.C (1989) Biosynthesis and characterization of poly(b-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **22**, 1106 - 1121.

Guérin, P., Renard, E. and Langlois, V. (2010) Degradation of natural and artificial poly [(R)-3-hydroxyalkanoate] s: from biodegradation to hydrolysis. In *Plastics from Bacteria*. pp.283-321: Springer.

Guezennec, J. (2002) Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **29**, 204 - 208.

Guezennec, J. (2004) Les bactéries des sources hydrothermales profondes à l'origine de nouvelles molécules bioactives? *Vertigo* **5**.

Guezennec, J., Herry, J.M., Kouzayha, A., Bachere, E., Mittelman, M.W. and Bellon Fontaine, M.N. (2012) Exopolysaccharides from unusual marine environments inhibit early stages of biofouling. *International Biodeterioration & Biodegradation* **66**, 1-7.

Guezennec, J., Moppert, X., Raguene, G., Richert, L., Costa, B. and Simon-Colin, C. (2011) Microbial mats in French Polynesia and their biotechnological applications. *Process Biochemistry* **46**, 16-22.

Guibaud, G., Bordas, F., Saaid, A., D'abzac, P. and Van Hullebusch, E. (2008) Effect of pH on cadmium and lead binding by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from environmental bacterial strains. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **63**, 48-54.

Guillemard, V., Guentas-Dombrowsky, L., Lobbens, E. and Payri, C. (2012) Evaluation of the anticancer potential of marine bacteria isolated from a New Caledonia's extreme environment. *Planta Med* **78**, 1161-1161.

Hall, T. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.

Hampson, J. and Ashby, R. (1999) Extraction of lipid-grown bacterial cells by supercritical fluid and organic solvent to obtain pure medium chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **76**, 1371-1374.

Hans-Cur, F. (1995) Sorption sites in biofilms. *Water Sci Technol* **32**, 27-33.

Harding, N.E., Raffo, S., Raimondi, A., Cleary, J.M. and Ielpi, L. (1993) Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursors of xanthan gum. Reading, ROYAUME-UNI: Society for General Microbiology.

He, W., Tian, W., Zhang, G., Chen, G.-Q. and Zhang, Z. (1998) Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS Microbiology Letters* **169**, 45-49.

Hejazi, P., Vasheghani-Farahani, E. and Yamini, Y. (2003) Supercritical Fluid Disruption of *Ralstonia eutropha* for Poly (β -hydroxybutyrate) Recovery. *Biotechnology progress* **19**, 1519-1523.

Helm, D. and Naumann, D. (1995) Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* **126**, 75-79.

Higashide, T. and Sugiyama, K. (2008) Use of viscoelastic substance in ophthalmic surgery—focus on sodium hyaluronate. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* **2**, 21.

Hildebrand, F., Meyer, A. and Eyre-Walker, A. (2010) Evidence of Selection upon Genomic GC-Content in Bacteria. *PLoS Genet* **6**, e1001107.

Hocking, P. and Marchessault, R. (1994) Biopolyesters. In *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers* eds. Griffin, G. and Professional, B.A. p.48. London

Holan, Z.R. and Volesky, B. (1994) Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 1001-1009.

Holmes, P.A. (1985) Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology* **16**, 32.

Holmes, P.A. and Lim, G.B. (1990) Separation process. In Patent and Trademark Office. Washington, DC: U.S.

Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S. and Kjelleberg, S. (2002) Antifouling activities expressed by marine surface associated *Pseudoalteromonas* species. *FEMS Microbiology Ecology* **41**, 47-58.

Holmström, C. and Kjelleberg, S. (1999) Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents. *FEMS Microbiology Ecology* **30**, 285-293.

Honma, T., Imamura, T., Kenmoku, T., Kobayashi, S. and Yano, T. (2004) Biosynthesis of Novel Poly(3-hydroxyalkanoates) Containing Benzoyl Groups. *Journal of Environmental Biotechnology* **4**, 49-55.

Iyer, A., Mody, K. and Jha, B. (2005) Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Marine Pollution Bulletin* **50**, 340-343.

Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S. and Wang, S.S. (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* **39**, 15-27.

Jacquel, N., Lo, C.-W., Wu, H.-S., Wei, Y.-H. and Wang, S.S. (2007) Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *AIChE Journal* **53**, 2704-2714.

Jeanthon, C. and Prieur, D. (1990) Susceptibility to Heavy Metals and Characterization of Heterotrophic Bacteria Isolated from Two Hydrothermal Vent Polychaete Annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3308-3314.

Jendrossek, D. (2001) Microbial Degradation of Polyesters. In *Biopolyesters*. pp.293-325: Springer Berlin Heidelberg.

Junge, K., Eicken, H. and Deming, J.W. (2004) Bacterial activity at -2 to -20 °C in Arctic Wintertime sea ice. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 550-557.

Kadouri, D., Jurkevitch, E. and Okon, Y. (2003) Involvement of the Reserve Material Poly-B-Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3244-3250.

Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. and Castro-Sowinski, S. (2005) Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* **31**, 55-67.

Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegthart, J.F. and Clamp, J.R. (1975) Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochem J* **151**, 491-495.

Kaplan, D.L. (1998) *Biopolymers from renewable resources*: Springer.

Kapritchkoff, F.M., Viotti, A.P., Alli, R.C., Zuccolo, M., Pradella, J.G., Maiorano, A.E., Miranda, E.A. and Bonomi, A. (2006) Enzymatic recovery and purification of

polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of Biotechnology* **122**, 453-462.

Kashima, K. and Imai, M. (2012) Advanced Membrane Material from Marine Biological Polymer and Sensitive Molecular-Size Recognition for Promising Separation Technology.

Kathiraser, Y., Aroua, M.K., Ramachandran, K.B. and Tan, I.K.P. (2007) Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **82**, 847-855.

Kavita, K., Mishra, A. and Jha, B. (2011) Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling* **27**, 309-317.

Keenan, T., Tanenbaum, S. and Nakas, J. (2005) Biodegradable polymers from renewable forest resources. In *Biodegradable Polymers for Industrial Applications* ed. R, S. pp.219-250. Florida, US.

Khan, T., Khan, H. and Park, J.K. (2007) Physical properties of a single sugar [alpha]-linked glucuronic acid-based oligosaccharide produced by a *Gluconacetobacter hansenii* strain. *Process Biochemistry* **42**, 252-257.

Kim, M., Park, J.-M., Um, H.-J., Lee, K.-H., Kim, H., Min, J. and Kim, Y.-H. (2011) The antifouling potentiality of galactosamine characterized from *Vibrio vulnificus* exopolysaccharide. *Biofouling* **27**, 851-857.

Kim, S.-K. and Mendis, E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International* **39**, 383-393.

Kim, S.-Y., Kim, J.-H., Kim, C.-J. and Oh, D.-K. (1996) Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnology Letters* **18**, 1161-1164.

Kim, S.J. and Yim, J.H. (2007) Cryoprotective Properties of Exopolysaccharide (P-21653) Produced by the Antarctic Bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. *The Journal of Microbiology* **45**, 510-514.

Kim, Y. and Lenz, R. (2001) Polyesters from microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology* **71**, 51-79.

Kimura, M. (1985) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*: Cambridge University Press.

Kitamura, S. and Doi, Y. (1994) Staining method of poly (3-hydroxyalkanoates acids) producing bacterial by Nile blue. *Biotechnology Techniques* **8**, 345–350.

Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R. and Gemeiner, P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* **29**, 17-25.

Köse, G.T., Korkusuz, F., Korkusuz, P., Purali, N., Özkul, A. and Hasırcı, V. (2003) Bone generation on PHBV matrices: an in vitro study. *Biomaterials* **24**, 4999-5007.

Köse, G.T., Korkusuz, F., Özkul, A., Soysal, Y., Özdemir, T., Yildiz, C. and Hasırcı, V. (2005) Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* **26**, 5187-5197.

Kratochvil, D. and Volesky, B. (1998) Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* **16**, 291-300.

Krembs, C., Eicken, H., Junge, K. and Deming, J.W. (2002) High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* **49**, 2163-2181.

Kristensen, E., Bouillon, S., Dittmar, T. and Marchand, C. (2008) Organic carbon dynamics in mangrove ecosystems: A review. *Aquatic Botany* **89**, 201-219.

Kunasundari, B. and Sudesh, K. (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Exp Poly Lett* **5**, 620-634.

Kuwada, K., Wamocho, L.S., Utamura, M., Matsushita, I. and Ishii, T. (2006) Effect of Red and Green Algal Extracts on Hyphal Growth of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, and on Mycorrhizal Development and Growth of Papaya and Passionfruit. *Agron J* **98**, 1340-1344.

Lakshman, K. and Shamala, T.R. (2006) Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. *Enzyme and microbial technology* **39**, 1471-1475.

Langmuir, I. (1918) The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society* **40**, 1361-1403.

Laurent, T.C. and Fraser, J.R. (1992) Hyaluronan. *The FASEB Journal* **6**, 2397-2404.

Le Costaouëc, T., Cérantola, S., Ropartz, D., Ratiskol, J., Siquin, C., Collic-Jouault, S. and Boisset, C. (2012) Structural data on a bacterial exopolysaccharide produced by a deep-sea *Alteromonas macleodii* strain. *Carbohydrate Polymers* **90**, 49-59.

Ledin, M. and Pedersen, K. (1996) The environmental impact of mine wastes — Roles of microorganisms and their significance in treatment of mine wastes. *Earth-Science Reviews* **41**, 67-108.

Ledoux, L. and Turner, R.K. (2002) Valuing ocean and coastal resources: a review of practical examples and issues for further action. *Ocean & Coastal Management* **45**, 583-616.

Lee, S.Y. (1996) Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology* **14**, 431-438.

Lee, W.-H., Loo, C.-Y., Nomura, C.T. and Sudesh, K. (2008) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource Technology* **99**, 6844-6851.

Lemetchko, P., Renard, E., Guezenec, J., Simon-Colin, C. and Langlois, V. (2012a) Synthesis of dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach. *Reactive and Functional Polymers* **72**, 487-494.

Lemetchko, P., Renard, E., Volet, G., Colin, C.S., Guezenec, J. and Langlois, V. (2012b) Functionalized oligoesters from poly(3-hydroxyalkanoate)s containing reactive end group for click chemistry: Application to novel copolymer synthesis with poly(2-methyl-2-oxazoline). *Reactive and Functional Polymers* **72**, 160-167.

Lemoigne, M. (1926) Produits de dehydration et de polymerisation de l'acide β -oxobutyrique. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* **8**, 770-782.

Lenz, R.W. and Marchessault, R.H. (2004) Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. *Biomacromolecules* **6**, 1-8.

Ley, J.D., Cattoir, H. and Reynaerts, A. (1970) The Quantitative Measurement of DNA Hybridization from Renaturation Rates. *European Journal of Biochemistry* **12**, 133-142.

Liebergessell, M., Rahalkar, S. and Steinbüchel, A. (2000) Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**, 186-194.

Lilly, V.G., Wilson, H.A. and Leach, J.G. (1957) Bacterial Polysaccharides: Laboratory-scale Production of Polysaccharides by Species of *Xanthomonas*. *Applied Microbiology* **6**, 105-108.

Linker, A. and Jones, R.S. (1966) A New Polysaccharide Resembling Alginic Acid Isolated from *Pseudomonads*. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 3845-3851.

Liu, H.-L., Chen, B.-Y., Lan, Y.-W. and Cheng, Y.-C. (2004) Biosorption of Zn(II) and Cu(II) by the indigenous *Thiobacillus thiooxidans*. *Chemical Engineering Journal* **97**, 195-201.

Liu, L., Liu, Y., Li, J., Du, G. and Chen, J. (2011) Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories* **10**, 99.

- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 224-230.
- Loaëc, M., Olier, R. and Guezennec, J. (1997a) Chelating properties of bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers* **35**, 65-70.
- Loaëc, M., Olier, R. and Guezennec, J. (1997b) Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research* **31**, 1171-1179.
- Logan, B.E. and Hunt, J.R. (1987) Advantages to microbes of growth in permeable aggregates in marine systems. *Limnology and Oceanography* **32**, 1034-1048.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Lu, W.-B., Shi, J.-J., Wang, C.-H. and Chang, J.-S. (2006) Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter* sp. J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials* **134**, 80-86.
- Luengo, J.M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E.a.R. (2003) Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 251-260.
- Madison, L.L. and Huisman, G.W. (1999) Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **63**, 21-53.
- Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H. and Yamane, T. (1999) Analyses of a Polyhydroxyalkanoic Acid Granule-Associated 16-Kilodalton Protein and Its Putative Regulator in the pha Locus of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bacteriology* **181**, 2914-2921.
- Mancuso Nichols, C.A., Garon, S., Bowman, J.P., Raguénès, G. and Guézennec, J. (2004) Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 1057-1066.
- Mandon, K., Michel-Reydellet, N., Encarnación, S., Kaminski, P.A., Leija, A., Cevallos, M.A., Elmerich, C. and Mora, J. (1998) Poly- β -Hydroxybutyrate Turnover in *Azorhizobium caulinodans* Is Required for Growth and Affects *nifA* Expression. *Journal of Bacteriology* **180**, 5070-5076.
- Manna, A. and Paul, A.K. (2000) Degradation of microbial polyester poly(3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture. *Biodegradation* **11**, 323-329.

- Manna, F., Dentini, M., Desideri, P., De Pità, O., Mortilla, E. and Maras, B. (1999) Comparative chemical evaluation of two commercially available derivatives of hyaluronic acid (Hylaform® from rooster combs and Restylane® from streptococcus) used for soft tissue augmentation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **13**, 183-192.
- Mao, C., Andrefou, S., Bothorel, V., Guezenec, M., Rougeaux, H., Guezenec, J., Deslandes, E., Trichet, J., Matheron, R., Le Campion, T., Payri, C. and Caumette, P. (2001) Physical, chemical, and microbiological characteristics of microbial mats (KOPARA) in the South Pacific atolls of French Polynesia. Ottawa, ON, CANADA: National Research Council of Canada.
- Marschessault, R.H., Monasterios, C.J., Morin, F.G. and Sundararajan, P.R. (1990) Chiral poly(β -hydroxyalkanoates): an adaptable helix influenced by the alkane side-chain. *International Journal of Biological Macromolecules* **12**, 158-165.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. and Willems, A. (2008) Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 200-214.
- Martínez, V., García, P., García, J.L. and Prieto, M.A. (2011) Controlled autolysis facilitates the polyhydroxyalkanoate recovery in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial biotechnology* **4**, 533-547.
- Matis, K.A., Zouboulis, A.I., Grigoriadou, A.A., Lazaridis, N.K. and Ekateriniadou, L.V. (1996) Metal biosorption-flotation. Application to cadmium removal. *Applied Microbiology and Biotechnology* **45**, 569-573.
- Matsusaki, H., Abe, H., Taguchi, K., Fukui, T. and Doi, Y. (2000) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant bacteria expressing the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas* sp. 61-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 401-409.
- Mayer, A.S. and Hamann, M. (2004) Marine Pharmacology in 2000: Marine Compounds with Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Anti-inflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Cardiovascular, Immune, and Nervous Systems and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Marine Biotechnology* **6**, 37-52.
- McCool, G.J. and Cannon, M.C. (2001) *PhaC* and *PhaR* Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* **183**, 4235-4243.
- Micheletti, E., Colica, G., Viti, C., Tamagnini, P. and De Philippis, R. (2008) Selectivity in the heavy metal removal by exopolysaccharide-producing cyanobacteria. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 88-94.

Minic, Z., Serre, V. and Hervé, G. (2006) Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes Rendus Biologies* **329**, 527-540.

Moellering Jr, R.C. (2011) Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* **37**, 2-9.

Molinski, T.F., Dalisay, D.S., Lievens, S.L. and Saludes, J.P. (2009) Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery* **8**, 69-85.

Montreuil J and Spik G (1963) Méthodes colorimétriques des glucides totaux. Microdosage des glucides. pp.1-131. France: Faculté des sciences de Lille.

Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G. and Strecker, G. (1986) Glycoproteins. Oxford IRL Press.

Moppert, X., Le Costaouec, T., Raguene, G., Courtois, A., Simon-Colin, C., Crassous, P., Costa, B. and Guezennec, J. (2009) Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**, 599-604.

Moreira, A.P.B., Pereira, N. and Thompson, F.L. (2010) Usefulness of a real time PCR platform for GC content and DNA-DNA hybridization similarity estimations in *Vibrios*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**, 2379-2383.

Morillo, J., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A. and Monteoliva-Sánchez, M. (2006) Production of a Metal-Binding Exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* Using Two-Phase Olive-Mill Waste as Fermentation Substrate. *Current Microbiology* **53**, 189-193.

Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N. and Duckworth, A.R. (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology* **70**, 15-25.

Muralidharan, J. and Jayachandran, S. (2003) Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Process Biochemistry* **38**, 841-847.

Murray, R.G.E., Brenner, I.D.J., Colwell, R.R., Vos, P.D. and Goodfellow, M. (1990) Report of the Ad Hoc Committee on Approaches to Taxonomy within the Proteobacteria?

Naessens, M., Cerdobbel, A., Soetaert, W. and Vandamme, E.J. (2005) Leuconostoc dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **80**, 845-860.

Nakajima, A. (2002) Electron spin resonance study of copper biosorption by bacteria. *Water Research* **36**, 2091-2097.

Nakajima, A., Yasuda, M., Yokoyama, H., Ohya-Nishiguchi, H. and Kamada, H. (2001) Copper biosorption by chemically treated *Micrococcus luteus* cells. *World J Microbiol Biotechnol* **17**, 343-347.

Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. and Swings, J. (2005) Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* **151**, 2141-2150.

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. *Marine Biotechnology* **7**, 253-271.

Nichols, C.M., Bowman, J.P. and Guezennec, J. (2005b) *Olleya marilimosa* gen. nov., sp. nov., an exopolysaccharide-producing marine bacterium from the family Flavobacteriaceae, isolated from the Southern Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1557-1561.

Nichols, M., Carol, G., Lardièrre, S., Bowman, J.P., Nichols, P.D., A.E. Gibson, J. and Guézennec, J. (2005c) Chemical Characterization of Exopolysaccharides from Antarctic Marine Bacteria. *Microbial Ecology* **49**, 578-589.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kähler, M. and Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**, 711-729.

Norberg AB and Persson H (1984) Accumulation of heavy-metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnology and Bioengineering* **26**, 239-246.

Numata, K. and Doi, Y. (2012) Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates by a Novel Facultatively Anaerobic *Vibrio* sp. under Marine Conditions. *Marine Biotechnology* **14**, 323-331.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology* **54**, 49-79.

Ortega-Morales, B.O., Santiago-García, J.L., Chan-Bacab, M.J., Moppert, X., Miranda-Tello, E., Fardeau, M.L., Carrero, J.C., Bartolo-Pérez, P., Valadéz-González, A. and Guezennec, J. (2007) Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **102**, 254-264.

Ortmann, I., Conrath, U. and Moerschbacher, B.M. (2006) Exopolysaccharides of *Pantoea agglomerans* have different priming and eliciting activities in suspension-cultured cells of monocots and dicots. *FEBS Letters* **580**, 4491-4494.

Osman, S.F., Fett, W.F., Irwin, P.L., Bailey, D.G., Parris, N. and O'Connor, J.V. (1993) Isolation and characterization of an exopolysaccharide depolymerase from *Pseudomonas marginalis* HTO41B. *Current Microbiology* **26**, 299-304.

Otero, A. and Vincenzini, M. (2003) Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology* **102**, 143-152.

Ozdemir, G., Ceyhan, N., Ozturk, T., Akirmak, F. and Cosar, T. (2004) Biosorption of chromium(VI), cadmium(II) and copper(II) by *Pantoea* sp. TEM18. *Chemical Engineering Journal* **102**, 249-253.

Öztürk, A. (2007) Removal of nickel from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Hazardous Materials* **147**, 518-523.

Ozturk, S., Aslim, B. and Suludere, Z. (2009) Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource Technology* **100**, 5588-5593.

Pasteur, L. (1861) On the viscous fermentation and the butyrous fermentation. In *Bulletin de la Societe Chimique de France* ed. 11, P. pp.30-31.

Peoples, O.P. and Sinskey, A.J. (1989) Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding beta-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *The Journal of biological chemistry* **264**, 15293-15297.

Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I. (2007) Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **82**, 233-247.

Piret, J., Lamontagne, J., Bestman-Smith, J., Roy, S., Gourde, P., Désormeaux, A., Omar, R.F., Juhász, J. and Bergeron, M.G. (2000) In Vitro and In Vivo Evaluations of Sodium Lauryl Sulfate and Dextran Sulfate as Microbicides against Herpes Simplex and Human Immunodeficiency Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 110-119.

Poirier, Y., Erard, N. and MacDonald-Comber Petétot, J. (2002) Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters* **207**, 97-102.

Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C. (1995) Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Biotechnology Advances* **13**, 142-150.

Poli, A., Anzelmo, G. and Nicolaus, B. (2010) Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. *Marine Drugs* **8**, 1779-1802.

Pötter, M. and Steinbüchel, A. (2006) Biogenesis and structure of polyhydroxyalkanoate granules. In *Inclusions in prokaryotes*. pp.109-136: Springer.

Prado Acosta, M., Valdman, E., Leite, S.G.F., Battaglini, F. and Ruzal, S.M. (2005) Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and their Exopolysaccharide. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 1157-1163.

Prashant R. Chawla, Ishwar B. Bajaj, Survase, S.A. and Singhal, R.S. (2009) Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology* **47**, 107-124.

Preusting, H., Nijenhuis, A. and Witholt, B. (1990) Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* **23**, 4220-4224.

Pringault, O., Duran, R., Jacquet, S. and Torrèton, J.-P. (2008) Temporal Variations of Microbial Activity and Diversity in Marine Tropical Sediments (New Caledonia Lagoon). *Microb Ecol* **55**, 247-258.

Pulz, O. and Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 635-648.

Qi, Q. and Rehm, B.H.A. (2001) Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology* **147**, 3353-3358.

Qin, G., Zhu, L., Chen, X., Wang, P.G. and Zhang, Y. (2007) Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbiology* **153**, 1566-1572.

Qiu, Y.-Z., Han, J. and Chen, G.-Q. (2006) Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 537-542.

Raguènes, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P. and Barbier, G. (1997a) *Vibrio diabolicus* sp. nov., a New Polysaccharide-Secreting Organism Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Polychaete Annelid, *Alvinella pompejana* *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 989-995.

Raguènes, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., Barbier, G. and Guezennec, J. (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 67-73.

Raguènes, G.H.C., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M., Rougeaux, H., Barbier, G. and Guezennec, J.G. (1997b) *Alteromonas infernus* sp. nov., a new

polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Microbiology* **82**, 422-430.

Rai, R., Yunos, D.M., Boccaccini, A.R., Knowles, J.C., Barker, I.A., Howdle, S.M., Tredwell, G.D., Keshavarz, T. and Roy, I. (2011) Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromolecules* **12**, 2126-2136.

Rasmussen, R.S. and Morrissey, M.T. (2007) *Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients*. In *Advances in Food and Nutrition Research* ed. Steve, L.T. pp.237-292: Academic Press.

Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T. and Steve, L.T. (2007) *Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients*. *Advances in Food and Nutrition Research* **52**, 237-292.

Read, R.R. and Costerton, J.W. (1987) Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 1080-1090.

Reddy, G.P., Hayat, U., Abeygunawardana, C., Fox, C., Wright, A.C., Maneval, D.R., Jr., Bush, C.A. and Morris, J.G., Jr. (1992) Purification and determination of the structure of capsular polysaccharide of *Vibrio vulnificus* M06-24. *Journal of Bacteriology* **174**, 2620-2630.

Rehm, B.H.A. (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochem J* **376**, 15-33.

Rehm, B.H.A. and Steinbüchel, A. (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 3-19.

Rehm, B.H.A. and Steinbüchel, A. (2005) Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases: The Key Enzymes of PHA Synthesis. In *Biopolymers Online: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.

Renard, E., Barbaud, C., Langlois, V. and Guérin, P. (2003) Artificial and Natural Functionalized Biopolyesters: From Macromolecular Skeleton Selection to Property Design by Ester Pendant Groups. In *Biodegradable Polymers and Plastics* eds. Chiellini, E. and Solaro, R. pp.301-312: Springer US.

Renard, E., Poux, A., Timbart, L., Langlois, V. and Guérin, P. (2005) Preparation of a Novel Artificial Bacterial Polyester Modified with Pendant Hydroxyl Groups. *Biomacromolecules* **6**, 891-896.

- Renard, E., Walls, M., Guérin, P. and Langlois, V. (2004) Hydrolytic degradation of blends of polyhydroxyalkanoates and functionalized polyhydroxyalkanoates. *Polymer degradation and stability* **85**, 779-787.
- Reusch, R.N. (1995) Low molecular weight complexed poly (3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. *Canadian journal of microbiology* **41**, 50-54.
- Reusch, R.N. and Sadoff, H.L. (1981) Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **145**, 889-895.
- Richert, L., Golubic, S., Guédès, R., Ratiskol, J., Payri, C. and Guezennec, J. (2005) Characterization of Exopolysaccharides Produced by Cyanobacteria Isolated from Polynesian Microbial Mats. *Current Microbiology* **51**, 379-384.
- Robbe, B. and Hladik, C.M. (1988) Perception et consommation du sel dans la société inuit de la côte orientale du Groenland: Le sucre et le sel. *Multilingue* **35**.
- Robijn, G.W., van den Berg, D.J.C., Haas, H., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1995) Determination of the structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sake* 0-1. *Carbohydrate Research* **276**, 117-136.
- Robyt, J. (1985) Dextran. In *Encyclopaedia of Polymer Science* eds. Kroschwitz, J. and Wiley-VCH. pp.753-767. New York.
- Roger, O., Kervarec, N., Ratiskol, J., Collic-Jouault, S. and Chevolut, L. (2004) Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Research* **339**, 2371-2380.
- Rougeaux, H., Guezennec, J., Carlson, R.W., Kervarec, N., Pichon, R. and Talaga, P. (1999a) Structural determination of the exopolysaccharide of *Pseudoalteromonas* strain HYD 721 isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research* **315**, 273-285.
- Rougeaux, H., Guezennec, M., Che, L.M., Payri, C., Deslandes, E. and Guezennec, J. (2001) Microbial Communities and Exopolysaccharides from Polynesian Mats. *Marine Biotechnology* **3**, 181-187.
- Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R. and Guezennec, J. (1999b) Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research* **322**, 40-45.
- Rougeaux, H., Pichon, R., Kervarec, N., Raguénès, G.H.C. and Guezennec, J. (1996) Novel bacterial exopolysaccharides from deep-sea hydrothermal vents. *Carbohydrate Polymers* **31**, 237-242.

Rougeaux, H., Talaga, P., Carlson, R.W. and Guezennec, J. (1998) Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis* originating from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research* **312**, 53-59.

Sabra, W., Zeng, A.P. and Deckwer, W.D. (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 315-325.

Saintpierre-Bonaccio, D., Amir, H., Pineau, R., Tan, G.Y.A. and Goodfellow, M. (2005) *Amycolatopsis plumensis* sp. nov., a novel bioactive actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 2057-2061.

Saintpierre-Bonaccio, D., Maldonado, L.A., Amir, H., Pineau, R. and Goodfellow, M. (2004) *Nocardia neocaledoniensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a New-Caledonian brown hypermagnesian ultramafic soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 599-603.

Saintpierre, D., Amir, H., Pineau, R., Sembiring, L. and Goodfellow, M. (2003) *Streptomyces yatensis* sp. nov., a novel bioactive streptomycete isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* **83**, 21-26.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**, 406-425.

Sall, T., Mudd, S. and Takagi, A. (1958) Polyphosphate accumulation and utilisation as related to synchronized cell division of *Corynebacterium diptheriae*. *Journal of Bacteriology* **76**, 640-645.

Salvat, B. (1982) Histoire des ressources marines vivantes du Pacifique Sud. *Journal de la Société des océanistes*, 275-281.

Sánchez, R.J., Schripsema, J., da Silva, L.F., Taciro, M.K., Pradella, J.G.C. and Gomez, J.G.C. (2003) Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *European Polymer Journal* **39**, 1385-1394.

Saravanan, P. and Jayachandran, S. (2008) Preliminary characterization of exopolysaccharides produced by a marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* (SBT 033). *Letters in Applied Microbiology* **46**, 1-6.

Satoh, Y., Minamoto, N., Tajima, K. and Munekata, M. (2002) Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of PhaC and PhaR. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 343-350.

Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W. and Davies, D.G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* **184**, 1140-1154.

Savvaidis, I., Hughes, M. and Poole, R. (2003) Copper biosorption by *Pseudomonas cepacia* and other strains. *World J Microbiol Biotechnol* **19**, 117-121.

Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. and Thompson, F.L. (2007) Inferring the Evolutionary History of *Vibrios* by Means of Multilocus Sequence Analysis. *Journal of Bacteriology* **189**, 7932-7936.

Schiller, N.L., Monday, S.R., Boyd, C.M., Keen, N.T. and Ohman, D.E. (1993) Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase gene (*algL*): cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **175**, 4780-4789.

Schooling, S.R. and Beveridge, T.J. (2006) Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms. *Journal of Bacteriology* **188**, 5945-5957.

Schwarzmann, S. and Boring, J.R. (1971) Antiphagocytic Effect of Slime from a Mucoid Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **3**, 762-767.

Sendil, D., Gürsel, I., L. Wise, D. and Hasırcı, V. (1999) Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release* **59**, 207-217.

Sengha, S.S., Anderson, A.J., Hacking, A.J. and Dawes, E.A. (1989) The Production of Alginate by *Pseudomonas mendocina* in Batch and Continuous Culture. *Journal of General Microbiology* **135**, 795-804.

Senior, P.J. and Dawes, E.A. (1973) The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal* **134**, 225-238.

Sevastianov, V.I., Perova, N.V., Shishatskaya, E.I., Kalacheva, G.S. and Volova, T.G. (2003) Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **14**, 1029-1042.

Shen, L., Haufe, J. and Patel, M.K. (2009) Product overview and market projection of emerging bio-based plastics PRO-BIP 2009: Utrecht University.

Sheu, D.-S., Wang, Y.-T. and Lee, C.-Y. (2000) Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* **146**, 2019-2025.

Shin, D.H., Ko, Y.G., Choi, U.S. and Kim, W.N. (2004) Design of High Efficiency Chelate Fibers with an Amine Group To Remove Heavy Metal Ions and pH-Related FT-IR Analysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **43**, 2060-2066.

Shoda, M. and Sugano, Y. (2005) Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng* **10**, 1-8.

Simon-Colin, C., Alain, K., Colin, S., Cozien, J., Costa, B., Guezennec, J and Raguénès, G.H.C. (2008a) A novel mcl PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezenei* sp. nov., isolated from a 'kopara' mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 581-586.

Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemechko, P., Kervarec, N. and Guezennec, J. (2012a) Development of a three-steps derivatization assay for the localization of double bond in monounsaturated monomers of poly-beta-hydroxyalkanoates by GC-MS. *Journal of Chromatography B* **900**, 64-70.

Simon-Colin, C., Gouin, C., Lemechko, P., Schmitt, S., Senant, A., Kervarec, N. and Guezennec, J. (2012b) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from alkanoates and glucose. *International Journal of Biological Macromolecules* **51**, 1063-1069.

Simon-Colin, C., Raguénès, G., Crassous, P., Moppert, X. and Guezennec, J. (2008b) A novel mcl-PHA produced on coprah oil by *Pseudomonas guezenei* biovar. tikehau, isolated from a "kopara" mat of French Polynesia. *International Journal of Biological Macromolecules* **43**, 176-181.

Simoni, R.D., Hill, R.L., Vaughan, M. and Hascall, V. (2002) The Discovery of Hyaluronan by Karl Meyer. *Journal of Biological Chemistry* **277**, e27.

Singh, R., Paul, D. and Jain, R.K. (2006) Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* **14**, 389-397.

Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D. (1992) Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1089-1094.

Slater, S.C., Voige, W.H. and Dennis, D.E. (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology* **170**, 4431-4436.

Slepecky, R.A. and Law, J.H. (1961) Synthesis and degradation of poly-b-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology* **82**, 37-42.

Smit, A.J. (2004) Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology* **16**, 245-262.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85.

Solaiman, D.K.Y., Ashby, R.D. and Foglia, T.A. (2000) Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology* **53**, 690-694.

Stackebrandt E and J, E. (2006) Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* **33**, 152-155.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A.D., Kräpfer, P., Maiden, M.C.J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G., Vauterin, L., Ward, A.C. and Whitman, W.B. (2002) Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1043-1047.

Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 846-849.

Steel, K.J. (1961) The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. *Journal of General Microbiology* **25**, 297-306.

Steinbüchel, A. (2001) Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience* **1**, 1-24.

Steinbüchel, A. and Schlegel, H.G. (1991) Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular Microbiology* **5**, 535-542.

Steinbüchel, A. and Valentin, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**, 219-228.

Stewart, P.S. and William Costerton, J. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358**, 135-138.

Subin, S.R., Varghese, S.M. and Bhat, S.G. (2013) Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates accumulating *Vibrio* sp. strain BTTC26 from marine sediments and its production kinetics. *Journal of Scientific & Industrial Research* **72**, 228-235.

Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **25**, 1503-1555.

Sullivan, C.W. and Palmisano, A.C. (1984) Sea Ice Microbial Communities: Distribution, Abundance, and Diversity of Ice Bacteria in McMurdo Sound, Antarctica, in 1980. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 788-795.

Sun, W., Cao, J.G., Teng, K. and Meighen, E.A. (1994) Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate in the luminescent bacterium, *Vibrio harveyi*, and regulation by the lux autoinducer, N-(3-hydroxybutanoyl)homoserine lactone. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20785-20790.

Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S. (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances* **25**, 148-175.

Sutherland, I. (2002) A sticky business. *Microbial polysaccharides: current products and future trends. Microbiology today* **29**, 70-71.

Sutherland, I.W. (1998) Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology* **16**, 41-46.

Sutherland, I.W. (2001) Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* **11**, 663-674.

Sutherland, I.W. (2005) Polysaccharides from microorganisms, plants and animals. *Biopolymers Online*.

Tan, L.T. (2007) Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* **68**, 954-979.

Taniguchi, I., Kagotani, K. and Kimura, Y. (2003) Microbial production of poly(hydroxyalkanoate) s from waste edible oils. *Green Chemistry* **5**, 545-548.

Thakor, N., Trivedi, U. and Patel, K.C. (2005) Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. *Bioresource Technology* **96**, 1843-1850.

Thompson, C., Vicente, A., Souza, R., Vasconcelos, A., Vesth, T., Alves, N., Ussery, D., Iida, T. and Thompson, F. (2009) Genomic taxonomy of vibrios. *BMC Evolutionary Biology* **9**, 258.

Thompson, C.C., Thompson, F.L. and Vicente, A.C.P. (2008) Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 617-621.

Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B. and Swings, J. (2005) Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5107-5115.

Thompson, F.L., Iida, T. and Swings, J. (2004) Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 403-431.

Tokiwa, Y. and Calabia, B. (2004) Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnol Lett* **26**, 1181-1189.

Tombolini, R., Povolò, S., Buson, A., Squartini, A. and Nuti, M.P. (1995) Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. *Microbiology* **141**, 2553-2559.

Torréton, J.-P., Rochelle-Newall, E., Pringault, O., Jacquet, S., Faure, V. and Briand, E. (2010) Variability of primary and bacterial production in a coral reef lagoon (New Caledonia). *Marine Pollution Bulletin* **61**, 335-348.

Troyano, E., Lee, S.-P., Rha, C.K. and Sinskey, A.J. (1996) Presence of acetate and succinate in the exopolysaccharide produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. *Carbohydrate Polymers* **31**, 35-40.

Tunali, S., Çabuk, A. and Akar, T. (2006) Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal* **115**, 203-211.

Uslu, G. and Tanyol, M. (2006) Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. *Journal of Hazardous Materials* **135**, 87-93.

Valappil, S.P., Misra, S.K., Boccaccini, A.R. and Roy, I. (2006) Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses. *Expert Review of Medical Devices* **3**, 853-868.

Valentin, H. and Steinbüchel, A. (1993) Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic-acid-synthase structural gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* **39**, 309-317.

Valentin, H. and Steinbüchel, A. (1995) Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. *J Environ Polym Degr* **3**, 169-175.

Valentin, H.E. and Dennis, D. (1997) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *Journal of Biotechnology* **58**, 33-38.

Vanderslice, R.W., Doherty, D.H., Capage, M., Betlach, M.R., Hassler, R.A., Henderson, N.M., Ryan-Graniero, J. and Tecklenberg, M. (1989) Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*. In *Biomedical and biotechnological advances in industrial polysaccharides* ed. V. Crescenzi, I.C.M.D., S. Paoletti, S. S. Stivala, & I. W. Sutherland. pp.145-156. New York: Gordon & Breach.

Veglio, F., Esposito, A. and Reverberi, A.P. (2002) Copper adsorption on calcium alginate beads: equilibrium pH-related models. *Hydrometallurgy* **65**, 43-57.

Villanueva, L., Del Campo, J. and Guerrero, R. (2010) Diversity and physiology of polyhydroxyalkanoate-producing and -degrading strains in microbial mats. *FEMS Microbiology Ecology* **74**, 42-54.

Volesky, B. and Holan, Z.R. (1995) Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* **11**, 235-250.

Volesky, B. and Naja, G. (2005) Biosorption: application strategies. In *International Biohydrometallurgy Symposium*.

Volova, T. (2004) Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates. *Polyhydroxyalkanoates - Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Applications*. New York: Nova Science Publishers, Inc.

Wai, S.N., Mizunoe, Y., Takade, A., Kawabata, S.-I. and Yoshida, S.-I. (1998) *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology, Stress Resistance, and Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3648-3655.

Wallen, L.L. and Rohwedder, W.K. (1974) PHA from activated sludge. *Environmental Science & Technology* **8**, 576-579.

Wang, G. (2006) Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **33**, 545-551.

Wang, H.-h., Zhou, X.-r., Liu, Q. and Chen, G.-Q. (2011) Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 1497-1507.

Wang, J. and Chen, C. (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances* **27**, 195-226.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. and Trüper, H.G. (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* **37**, 463-464.

Wei, Y.-H., Chen, W.-C., Wu, H.-S. and Janarthanan, O.-M. (2011) Biodegradable and Biocompatible Biomaterial, Polyhydroxybutyrate, Produced by an Indigenous *Vibrio* sp. BM-1 Isolated from Marine Environment. *Marine Drugs* **9**, 615-624.

Weiner, R.M. (1997) Biopolymers from marine prokaryotes. *Trends in Biotechnology* **15**, 390-394.

Weiss, J., Takhistov, P. and McClements, D.J. (2006) Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science* **71**, R107-R116.

Wiggam, M.I., O'Kane, M.J., Harper, R., Atkinson, A.B., Hadden, D.R., Trimble, E.R. and Bell, P.M. (1997) Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxybutyrate concentration as the endpoint of emergency management: a randomized controlled study. *Diabetes care* **20**, 1347-1352.

Wilkes, J.S. and Zaworotko, M.J. (1992) Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 965-967.

Williams, S. and Martin, D. (2002) Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In *Biopolymers: Polyesters* 3 ed. Wiley, D.Y.a.S.A. pp.91-128. VCH, Weinheim.

Wilson, G.S., Raftos, D.A. and Nair, S.V. (2011) Antimicrobial activity of surface attached marine bacteria in biofilms. *Microbiological Research* **166**, 437-448.

Winder, C.L., Gordon, S.V., Dale, J., Hewinson, R.G. and Goodacre, R. (2006) Metabolic fingerprints of *Mycobacterium bovis* cluster with molecular type: implications for genotype–phenotype links. *Microbiology* **152**, 2757-2765.

Wingender, J., Neu, T. and Flemming, H.-C. (1999) What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances? In *Microbial Extracellular Polymeric Substances* eds. Wingender, J., Neu, T. and Flemming, H.-C. pp.1-19: Springer Berlin Heidelberg.

Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R. and Korbe, D.R. (1999) Function of EPS. In *Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function* ed. Wingender, J., Neu, T.R., Flemming H.-C. pp.171-200. New York: Springer-Verlag.

Wu, J., Nantz, M.H. and Zern, M.A. (2002) Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications. *Frontiers in bioscience* **7**, 717.

Xu, H.X., Kawamura, Y., Li, N., Zhao, L., Li, T.M., Li, Z.Y., Shu, S. and Ezaki, T. (2000) A rapid method for determining the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 1463-1469.

Yamada, T. and Kawasaki, T. (2005) Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**, 521-528.

Young, L., Brandrup, J. and Immergut, E. (1975) *Polymer handbook*. Wiley-Interscience, New York, 105.

Zhou, W., Wang, J., Shen, B., Hou, W. and Zhang, Y. (2009) Biosorption of copper(II) and cadmium(II) by a novel exopolysaccharide secreted from deep-sea mesophilic bacterium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **72**, 295-302.

Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **53**, 5-21.

ZoBell, C.E. (1941) Studies on marine bacteria. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research* **4**, 42-75.