



HAL
open science

Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

Guillaume Pierre

► **To cite this version:**

Guillaume Pierre. Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2010. Français. NNT : 2010LAROS314 . tel-00618169

HAL Id: tel-00618169

<https://theses.hal.science/tel-00618169>

Submitted on 1 Sep 2011

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 ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR CNRS 6250

THÈSE

Présentée par :

Guillaume PIERRE

Soutenue le 06 décembre 2010

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biochimie

Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

JURY :

M.N. Bellon-Fontaine
S. Collic-Jouault
C. Dupuy
M. Graber
T. Maugard
F. Orvain

Professeur, INRA Agro-Paris Tech, Massy, Rapporteur
Chargé de recherche, HDR, IFREMER, Nantes, Rapporteur
Professeur, Université de La Rochelle
Professeur, Université de La Rochelle, Co-Directeur de thèse
Professeur, Université de La Rochelle, Co-Directeur de thèse
Maître de conférences, Université de Caen Basse-Normandie



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE
Sciences pour l'Environnement Gay Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR CNRS 6250

THÈSE

Présentée par :

Guillaume PIERRE

Soutenue le 06 décembre 2010

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biochimie

Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

JURY :

M.N. Bellon-Fontaine
S. Collic-Jouault
C. Dupuy
M. Graber
T. Maugard
F. Orvain

Professeur, INRA Agro-Paris Tech, Massy, Rapporteur
Chargé de recherche, HDR, IFREMER, Nantes, Rapporteur
Professeur, Université de La Rochelle
Professeur, Université de La Rochelle, Co-Directeur de thèse
Professeur, Université de La Rochelle, Co-Directeur de thèse
Maître de conférences, Université de Caen Basse-Normandie

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

En lien direct avec ce travail :

Pierre, G., Graber, M., Orvain, F., Dupuy, C., Maugard, T., 2010. Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 917-923.

Pierre, G., Graber, M., Rafiliposon, B.A., Dupuy, C., Orvain, F., De Crignis, M., Maugard, T. Biochemical composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced during microphytobenthic biofilm development on an intertidal mudflat of a macrotidal bay. *Soumis, Journal of Experimental Biology and Ecology.*

Pierre, G., Sopena, V., Juin, C., Mastouri, A., Graber, M., Maugard, T. Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Soumis, pour Biotechnology and Bioprocess Engineering.*

Pierre, G., Jazzar, S., Villéger, R., Maugard, T., Bellon-Fontaine, M.N., Graber, M. Inverse Gas Chromatography applied to microorganisms: a novel method to determine the surface properties of microbial cells. *En préparation, pour Colloids and Surface B: Biointerfaces.*

Pierre, G., Graber, M., Dupuy, C., Orvain, F., Maugard, T. Seasonal and environmental impacts on the composition and dynamic of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced by a microphytobenthic biofilm on an intertidal mudflat. *En préparation, pour Journal of Experimental Biology and Ecology.*

¹**Pierre, G.**, Jazzar, S., Villéger, R., Maugard, T., Bellon-Fontaine, M.N., Graber, M., 2010. Inverse Gas Chromatography: a novel method to determine the surface properties of microbial cells. *Biofilm IV. Winchester, 01-03 septembre 2010.*

¹**Pierre, G.**, Graber, M., Dupuy, C., Orvain, F., Maugard, T., 2009. Caractérisation biochimique de Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) extraites des vasières de Marennes-Oléron. *25^{ème} forum des jeunes océanographes. Université de La Rochelle, 28-29 octobre 2009. Premier Prix (100€), décerné pour la meilleure communication affichée.*

¹ Communication affichée.

Autres :

Marton, Z., Chaput, L., **Pierre, G.**, Graber, M., 2010. Lipase hydration state in the gas phase: sorption isotherm measurements and inverse gas chromatography. *Biotechnol. J.* 5, 1216-1225.

Pierre, G., Goude, R., Maache-Rezzoug, Z., Rezzoug, S.A., Nouviaire, A., Sannier, F., Maugard, T. Evaluation of thermomechanical pretreatment for enzymatic hydrolysis of pure microcrystalline cellulose and cellulose from brewers' spent grain. *Soumis, Journal of Cereal Science.*

Pierre, G., Goude, R., Maache-Rezzoug, Z., Maugard, T. High-performance hydrolysis of wheat straw using cellulase and thermomechanical pretreatment. *Soumis, Process Biochemistry.*

A Maya,

La capacité d'apprendre est un don ;

La faculté d'apprendre est un talent ;

La volonté d'apprendre est un choix.

B. Herbert

Ce travail a été réalisé au laboratoire Littoral ENvironnement et Sociétés (ULR LIENSs, UMR 6250 CNRS) de l'Université de La Rochelle. Je tiens tout d'abord à remercier M. Sylvain Lamare, Professeur à l'Université de La Rochelle et responsable de l'unité de recherche LIENSs, de la confiance qu'il a su m'accorder il y a plusieurs années en m'accueillant au sein du laboratoire. Vous m'avez permis de mettre un pied dans l'univers de la Recherche et de l'Enseignement supérieur.

Je remercie vivement Mme Marianne Graber et M. Thierry Maugard, Professeurs à l'Université de La Rochelle, d'avoir accepté d'être mes directeurs de thèse. Je tiens à vous exprimer toute ma sympathie pour vos conseils avisés, votre rigueur scientifique, votre disponibilité et pour vos valeurs morales et humaines qui m'auront permis d'avancer au cours de ces années trop riches en bouleversements éprouvants.

Très honoré, je remercie sincèrement Mme Sylvia Collic-Jouault, Chargé de recherche à l'IFREMER de Nantes, et Mme Marie-Noëlle Bellon-Fontaine, Professeur à l'Unité de Recherche en Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (UBHM) de l'INRA de Massy, pour l'intérêt qu'elles ont bien voulu porté à ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Je souhaite par ailleurs exprimer toute ma gratitude à Marie-Noëlle pour avoir encouragé ce travail et m'avoir si chaleureusement accueilli au sein de son équipe. Je tiens également à exprimer ma sympathie envers M. Jean-Marie Herry, M. Thierry Meylheuc et Mlle Margareth Renault de l'UBHM.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Christine Dupuy, Professeur à l'Université de La Rochelle, et à M. Francis Orvain, Maître de conférences à l'Université de Caen Basse-Normandie pour leur participation active dans ce travail. Merci également d'avoir accepté de participer à cette commission d'examen. Vous m'avez initié à l'écologie benthique !

Je souhaite exprimer mon amitié durable à Sam le Jardinier, Jujika, Mambo 5, Ma Poulette Brune, Maman Crobio et Grand Nico, qui se reconnaîtront. Je n'oublie pas Romain, Beby, Claire, Nicolas et Claire la Sainte. Merci d'avoir animé le laboratoire et nos soirées ! Une pensée particulière pour les anciens parents du Tartarin, à cette belle époque révolue !

Enfin, je dédie ce travail à ma famille, à mon père Jean-François et à ma maman Nadia, à mes frères Benjamin et Nicolas, ainsi qu'à ma chérie. Soizic, j'espère du fond du cœur terminer le chemin de la vie à tes côtés.

7 ABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	5
LISTE DES FIGURES.....	9
LISTE DES TABLEAUX	15
INTRODUCTION	17
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
I.1 LES SUBSTANCES POLYMERIQUES D'ORIGINE ALGALE.....	25
<i>I.1.1 La matière première d'origine : les algues</i>	<i>25</i>
I.1.1.1 Classification des algues.....	25
I.1.1.2 Mode de reproduction.....	30
<i>I.1.2 Les substances polymériques algales.....</i>	<i>30</i>
I.1.2.1 Fractions polysaccharidiques.....	31
I.1.2.2 Fractions protéiques	37
I.1.2.3 Fractions lipidiques.....	39
<i>I.1.3 Rôles et enjeux des algues.....</i>	<i>41</i>
I.1.3.1 Ecologie des algues : des organismes aquatiques essentiels à la vie sur Terre.....	41
I.1.3.2 Industrialisation des algues : des végétaux marins au service de l'activité humaine ?	42
I.1.3.3 Confrontation entre enjeux économiques et environnementaux	43
<i>I.1.4 L'industrialisation des substances polymériques algales.....</i>	<i>45</i>
I.1.4.1 En agro-alimentaire.....	46
I.1.4.2 En pharmacologie et médecine	49
I.1.4.3 En cosmétologie	51
I.1.4.4 Autres applications.....	52
<i>I.1.5 La compréhension fondamentale du rôle de ces substances polymériques dans différents contextes</i>	<i>54</i>
I.2 LES BIOFILMS MICROBIENS	57
<i>I.2.1 Généralités</i>	<i>57</i>
I.2.1.1 Diversité des biofilms	58
I.2.1.2 Rôles et enjeux des biofilms	64
<i>I.2.2 Mécanismes de formation d'un biofilm</i>	<i>65</i>
I.2.2.1 Le transport	66
I.2.2.2 L'adhésion initiale.....	67
I.2.2.3 La consolidation.....	70
I.2.2.4 La colonisation.....	70

1.2.3	<i>Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion</i>	71
1.2.3.1	L'énergie libre de surface.....	71
1.2.3.2	L'approche thermodynamique	72
1.2.3.3	L'approche de l'adhésion par la théorie DLVO	72
1.2.4	<i>Phénomènes d'adsorption physico-chimiques à l'origine de l'adhésion primaire</i>	74
1.2.4.1	Interactions de Lifshitz-van der Waals	75
1.2.4.2	Interactions électrostatiques.....	78
1.2.4.3	Interactions polaires.....	80
1.2.4.4	Interactions liées au mouvement Brownien	83
1.2.5	<i>Méthodes classiques d'analyse des propriétés de surface de micro-organismes</i>	84
1.2.5.1	Zétamétrie	84
1.2.5.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	85
1.2.5.3	Mesure des angles de contact de surface bactérienne	90
1.2.5.4	Méthode de partition MATS (Microbial Adhesion To Solvents)	94
1.2.6	<i>La Chromatographie Gazeuse Inverse : un nouvel outil pour l'analyse des propriétés globales de surface de micro-organismes</i>	96
1.2.6.1	Généralités.....	96
1.2.6.2	Grandeurs expérimentales.....	98
1.2.6.3	La thermodynamique appliquée à la CGI	100
II.	MATERIEL ET METHODES	113
II.1	CARACTERISATION DE SUBSTANCES POLYMERIQUES D'ORIGINE ALGALE	113
II.1.1	<i>Prélèvements d'échantillons in situ</i>	113
II.1.1.1	Echantillons de macro-algues.....	113
II.1.1.2	Echantillons de sédiment riche en micro-algues.....	113
II.1.1.3	Paramètres environnementaux	114
II.1.2	<i>Extraction et purification de Substances Polymériques Extracellulaires</i>	114
II.1.2.1	Polysaccharides extractibles à partir du mucilage de la macro-algue <i>Chaetomorpha aerea</i>	114
II.1.2.2	SPE extractibles à partir de sédiments riches en diatomées	117
II.1.3	<i>Analyses biochimiques de SPE par spectrophotométrie</i>	119
II.1.3.1	Dosage des sucres totaux	119
II.1.3.2	Dosage des acides uroniques	121
II.1.3.3	Dosage des groupements sulfates	122
II.1.3.4	Dosage des protéines	124

II.1.4	<i>Composition osidique : identification et quantification</i>	126
II.1.4.1	Purification des polysaccharides par dialyse	126
II.1.4.2	Dépolymérisation des polysaccharides.....	127
II.1.4.3	Degré de dépolymérisation : hydrolyse ménagée ou hydrolyse totale.....	129
II.1.4.4	Analyse des polysaccharides par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	131
II.1.4.5	Analyse des résidus glycosidiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP).....	132
II.1.4.6	Analyse des résidus glycosidiques sous forme de dérivés triméthylsilylés par CPG/SM.....	136
II.1.5	<i>Propriétés antimicrobiennes</i>	138
II.1.5.1	Antibiogrammes : activité antibactérienne	138
II.1.5.2	Antibiogrammes : activité antifongique	140
II.2	DETERMINATION DES PROPRIETES DE SURFACE DE MICRO-ORGANISMES	142
II.2.1	<i>Préparation des cellules bactériennes</i>	142
II.2.1.1	Micro-organismes étudiés	142
II.2.1.2	Culture des bactéries	143
II.2.1.3	Culture de la micro-algue	144
II.2.1.4	Préparation de la biomasse et lyophilisation	145
II.2.1.5	Viabilité des cellules après lyophilisation	146
II.2.2	<i>Méthodes classiques d'analyse des propriétés globales de surface de micro-organismes</i>	148
II.2.2.1	Charge globale de surface de cellules bactériennes	148
II.2.2.2	Composition moléculaire de surface de cellules bactériennes.....	149
II.2.2.3	Mesure des angles de contact de surfaces bactériennes	150
II.2.2.4	Méthode de partition MATS.....	152
II.2.2.5	Caractérisation de la surface de micro-organismes par Microscopie de Force Atomique.....	154
II.2.3	<i>Détermination des propriétés de surface de micro-organismes par Chromatographie Gazeuse Inverse</i>	155
II.2.3.1	Mise au point de la méthode d'analyse.....	155
II.2.3.2	Analyse des propriétés de surface de différents micro-organismes par CGI	162
III.	RESULTATS COMMENTES	171
III.1	CARACTERISATION ET DYNAMIQUE DE SUBSTANCES POLYMERIQUES D'ORIGINE ALGALE.....	171
III.1.1	<i>Caractérisation partielle de substances polymériques matricielles extraites de la macro-algue <i>Chaetomorpha aerea</i></i>	171
III.1.1.1	Conditions d'extraction et optimisation	171
III.1.1.2	Caractérisation de la fraction saccharidique	174
III.1.1.3	Activité antimicrobienne des extraits	181

III.1.2	<i>Composition et dynamique des Substances Polymériques Extracellulaires dans la formation de biofilms benthiques : impacts environnementaux au sein des vasières intertidales charentaises</i>	185
III.1.2.1	Normalisation et analyses statistiques des résultats	187
III.1.2.2	Validation de l'étude et limitations méthodologiques.....	188
III.1.2.3	Dynamique de production de SPE durant la formation d'un biofilm microphytobenthique	194
III.1.2.4	Distribution en monosaccharides des SPE.....	205
III.1.2.5	Les bactéries benthiques, organismes intimement liés à la formation du biofilm benthique	211
III.1.2.6	Conclusion	214
III.2	ETUDE DES PROPRIETES DE SURFACE DE MICRO-ORGANISMES DANS L'ELABORATION DE BIOFILMS.....	217
III.2.1	<i>Préparation des cellules microbiennes</i>	218
III.2.1.1	Culture de routine et standardisation.....	218
III.2.1.2	Effets de la lyophilisation sur la surface des micro-organismes	219
III.2.2	<i>Comparaison des différentes méthodes classiques d'analyse des propriétés globales de surface des micro-organismes modèles</i>	222
III.2.2.1	Charge globale de surface des cellules bactériennes.....	222
III.2.2.2	Composition moléculaire de surface des micro-organismes.....	225
III.2.2.3	Mesure des angles de contact de tapis bactériens	229
III.2.2.4	Méthode de partition Microbial Adhesion To Solvents (MATS)	238
III.2.3	<i>Détermination des propriétés de surface de micro-organismes par Chromatographie Gazeuse Inverse</i>	243
III.2.3.1	Mise au point de la méthode d'analyse.....	243
III.2.3.2	Analyse des propriétés de surface de différents micro-organismes	253
III.2.4	<i>La Chromatographie Gazeuse Inverse : méthode alternative ou méthode complémentaire pour la mesure des propriétés de surface de micro-organismes ?</i>	261
III.2.4.1	Confrontation entre les propriétés de surface des micro-organismes déterminées par CGI ou par des méthodes classiques.....	261
III.2.4.2	Amélioration de la méthodologie utilisée en CGI.....	263
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	271
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	272
	ANNEXES	272

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AC : Angle de contact
- ACP : Analyse en composantes principales
- ACP : Allophycocyanine
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AFM : Microscopie de force atomique
- AMPc : Adénosyl monophosphate cyclique
- AN : Nombre accepteur (nature acide au sens de Lewis)
- ARN : Acide ribonucléique
- ATR : Réflexion totale atténuée
- AW : Acid wash
- BCA : Acide bicinchoninique
- BHI : Brain heart infusion
- BPM : Bas poids moléculaire
- BSTFA : *N,O*-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
- CCA : Contenu en chlorophylle *a*
- CCM : Chromatographie sur couche mince
- CGC : Contenu glucidique colloïdal
- CGI : Chromatographie gazeuse inverse
- CGI-CF : Chromatographie gazeuse inverse à concentration finie
- CGI-DI : Chromatographie gazeuse inverse en dilution infinie
- CLHP : Chromatographie liquide haute performance
- CMB : Concentration minimale bactéricide
- CMI : Concentration minimale inhibitrice
- CPG : Chromatographie en phase gazeuse
- eSPE : Extraits colloïdaux de substances polymériques extracellulaires
- DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
- DMCS : Diméthylchlorosilane
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- DN : Nombre donneur (nature basique au sens de Lewis)

DNS : 3,5-dinitrosalicylate

DO : Degré optique

ΔG_a° : Variation de l'enthalpie libre standard d'adsorption

ΔG_{12}^{AB} : Energie d'interaction liée aux forces acide/base de Lewis entre deux corps

ΔG_{123}^{AB} : Energie d'interaction liée aux forces acide/base de Lewis entre un micro-organisme (1) et un support (2) immergés dans un liquide (3)

ΔG_{adh} : Energie d'adhésion

ΔG^{BR} : Energie libre brownienne

ΔG^{EL} : Energie libre due aux interactions électrostatiques entre une sphère et une surface plane

ΔG_{12}^{LW} : Energie d'interaction liée aux forces de Lifshitz-van der Waals entre deux corps

ΔG_{123}^{LW} : Energie d'interaction liée aux forces de Lifshitz-van der Waals entre un micro-organisme (1) et un support (2) immergés dans un liquide (3)

ΔG_{ads}^{SP} : Enthalpies libres d'adsorption spécifique

DLVO : Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek

DO : Densité optique

Dw : Dry weight

E400, E404, E407 : Edulcorants et additifs alimentaires

EI : Impact électronique

ELS : Energie libre superficielle

EMA : Eau de mer artificielle

EPS : Exopolysaccharides

ESB : Encéphalite spongiforme bovine

FAO : Food and agricultural organization

FID : Détecteur à ionisation de flamme

γ : Energie de surface ou tension de surface d'un corps

γ^- : Caractéristique électron-donneur ou Lewis-base de la composante acide/base de l'énergie de surface

γ^+ : Caractéristique électron-accepteur ou Lewis-acide de la composante acide/base de l'énergie de surface

γ^{AB} : Composante acide/base de l'énergie de surface

γ_S^D : Composante dispersive de l'énergie de surface d'un solide

γ_S^{SP} : Composante spécifique de l'énergie de surface d'un solide

γ^{LW} : Composante de Lifshitz-van der Waals de l'énergie de surface

γ_{12}^{LW} : Tension interfaciale liée aux forces de Lifshitz-van der Waals entre deux corps

γ_S : Energie libre de surface

γ_S^t : Composante totale de l'énergie de surface d'un solide

GN : Gélose nutritive

GAGs : Glycosaminoglycanes

GVOC : Good-van Oss-Chaudhury

G_T : Energie totale de Gibbs

HA : *Hafnia alvei*

HB : Substances polymériques extracellulaires récoltées après un traitement au bicarbonate chaud

HPM : Haut poids moléculaire

HSV : Herpes simplex virus

HW : Substances polymériques extracellulaires obtenues après extraction à l'eau chaude

IAA : Industries agro-alimentaires

IR : Rayonnement infrarouge

IRTF : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

λ : Longueur d'onde

LL : *Lactococcus lactis*

LPS : Lipopolysaccharides

MAP : Modulation par amplitude d'impulsion

MATH : Microbial adhesion to hydrocarbon

MATS : Microbial adhesion to solvents

ME : Mobilité électrophorétique

MEB : Microscopie électronique à balayage

MH : Muller hinton

MHDP : *mé*ta-hydroxydiphényle

m/m : masse à masse

m/v : masse à volume

NAG : N-acétyl glucosamine

NAM : Acide N-acétylmuramique

NJ : *Navicula jeffreyi*

ω_3 , ω_6 : Oméga 3, oméga 6

OMP : Outer membrane proteins

OMS : Organisation mondiale de la santé

Par. Opt. : Paramètre optimal

PC : Phycocyanine

PCA : Plate count agar

PCN : Point de charge nulle

PE : Phycoérythrine

PSM : Poste de sécurité microbien

RMN : Résonance magnétique nucléaire)

SM : Spectrométrie de masse

Ψ_0 : Potentiel de surface d'une particule

sp. : sub specie

SPE : Substances polymériques extracellulaires

θ : Angle de contact

TMCS : Triméthylchlorosilane

TPS : Tampon phosphate salin

TSB : Trypton soy broth, trypto-caséine soja

U_{Debye} : Energie produite par les forces de Debye

U_{Keesom} : Energie produite par les forces de Keesom

U_{London} : Energie produite par les forces de London

UFC : Unité(s) formant colonie

V_G : Volume spécifique de rétention

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

v/v : Volume à volume

v/v/v : Volume à volume à volume

W_{SL} : Travail d'adhésion entre un solide et un liquide

YPD : Yeast peptone dextrose, levure peptone dextrose

ξ : potentiel zêta ou potentiel électrocinétique d'une particule mesuré dans la couche diffuse et au voisinage de la couche de Stern

LISTE DES FIGURES

FIGURE I.1-1 : STRUCTURES DES DIFFERENTES CHLOROPHYLLES.	27
FIGURE I.1-2 : STRUCTURES DES PHYCOBILINES.	28
FIGURE I.1-3 : TRAJET DE L'ÉNERGIE LUMINEUSE DANS LES ANTENNES COLLECTIVES.	29
FIGURE I.1-4 : EXEMPLE D'UN GLUCURONOXYLORHAMNANE SULFATE.	34
FIGURE I.1-5 MOTIFS OSIDIQUES DE BASE DES (A) AGAROCOLLOÏDES ET DES (B) CARRAGHENANES.	35
FIGURE I.1-6 : STRUCTURE PRIMAIRE (A) DES CHAINES DE FUCOSE A-(1,2) DES FUCANES ET (B) DE L'ALGINATE.	36
FIGURE I.1-7 : MODELE D'ORGANISATION DE LA PAROI DES ALGUES BRUNES, D'APRES KLOAREG ET AL. (1986).....	36
FIGURE I.1-8 : MODELE DE REPARTITION DE L'UTILISATION DES ALGUES EN 2001, ADAPTE DE GARON-LARDIERE (2004).	45
FIGURE I.1-9 : VEGETAUX MARINS CONSOMMES AUTREFOIS OU ACTUELLEMENT PAR L'HOMME, D'APRES PEREZ (1997). LA COULEUR DE LA BANDE CENTRALE INDIQUE LE PHYLUM AUQUEL APPARTIENNENT CES ESPECES.	48
FIGURE I.2-1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE PAROI DES BACTERIES A COLORATION DE GRAM POSITIF ET NEGATIF, D'APRES BOUTALEB (2007). 1 : PAROI, 2 : ESPACE PERIPLASMIQUE, 3 : MEMBRANE PLASMIQUE, 4 : ACIDE TEICHOÏQUE, 5 : ACIDE LIPOTEICHOÏQUE, 6 : PHOSPHOLIPIDE, 7 : PROTEINE INTRINSEQUE, 8 : PEPTIDOGLYCANE, 9 : LIPOPROTEINES DE BRAUN, 10 : LIPOPOLYSACCHARIDES, 11 : PORINES, 12 : CHAINES LATERALES ANTIGENIQUES O.....	60
FIGURE I.2-2 : ÉTAPES DE LA FORMATION D'UN BIOFILM.....	66
FIGURE I.2-3 : SCHEMA DESCRIPTIF DES INTERACTIONS IMPLIQUEES DANS L'ÉTAPE D'ADHESION INITIALE.....	68
FIGURE I.2-4 : REPRESENTATION DES FORCES D'INTERACTIONS EN SURFACE ET EN PROFONDEUR, D'APRES COMTE (2004).	71
FIGURE I.2-5 : LES TROIS TYPES D'INTERACTIONS DE LIFSHITZ-VAN DER WAALS, D'APRES BOUTALEB (2007).	76
FIGURE I.2-6 : STRUCTURE DE LA DOUBLE COUCHE IONIQUE, D'APRES HIEMENZ (1997).....	78
FIGURE I.2-7 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VARIATION DE POTENTIEL EN FONCTION DE LA DISTANCE DE LA PARTICULE CHARGÉE, D'APRES JAMES (1991).....	79
FIGURE I.2-8 : POTENTIEL ANHARMONIQUE ET NIVEAUX D'ÉNERGIE VIBRATIONNELLE.	86
FIGURE I.2-9 : ANGLE DE CONTACT A L'ÉQUILIBRE SUR UNE SURFACE SOLIDE (LIT BACTERIEN).....	91
FIGURE I.2-10 : SYSTEME DE LA CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE INVERSE.	97
FIGURE I.2-11 : DETERMINATION DU TEMPS NET DE RETENTION.....	99
FIGURE I.2-12 : VARIATION DE L'ENTHALPIE LIBRE D'ADSORPTION EN FONCTION DU NOMBRE D'ATOMES DE CARBONE DES ALCANES LINEAIRES INJECTES.	103
FIGURE I.2-13 : DETERMINATION DE L'ENTHALPIE LIBRE D'ADSORPTION SPECIFIQUE.	105
FIGURE II.1-1 : STATION DE PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS DE SEDIMENT.	113
FIGURE II.1-2 : METHODE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION MISE AU POINT POUR L'ÉTUDE DE POLYSACCHARIDES PARIETAUX D'ORIGINE ALGALE.	116
FIGURE II.1-3 : ADAPTEE A PARTIR DU MODELE D'UNDERWOOD & PATERSON (2003), HYPOTHESE DE LOCALISATION DES DIFFERENTES FRACTIONS DE SPE RECOLTEES PAR LA METHODE D'EXTRACTION DE TAKAHASHI ET AL. (2009).	117
FIGURE II.1-4 : PRINCIPE DU DOSAGE COLORIMETRIQUE DES SUCRES TOTAUX PAR LA METHODE DE DUBOIS ET AL. (1956).....	120

FIGURE II.1-5 : GAMME D'ETALONNAGE DU GLUCOSE ET ZONE DE LINEARITE DE LA METHODE DE DUBOIS ET AL. (1956).	120
FIGURE II.1-6 : PRINCIPE DU DOSAGE COLORIMETRIQUE DES ACIDES URONIQUES PAR LA METHODE DE BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973).	121
FIGURE II.1-7 : GAMME D'ETALONNAGE DE L'ACIDE GALACTURONIQUE ET ZONE DE LINEARITE DE LA METHODE DE BLUMENKRANTZ & ASBOE-HANSEN (1973).	122
FIGURE II.1-8 : PRINCIPE DU DOSAGE COLORIMETRIQUE DES SULFATES PAR LA METHODE DE JAKES ET AL. (1968).	123
FIGURE II.1-9 : GAMME D'ETALONNAGE DU SULFATE DE DEXTRANE ET ZONE DE LINEARITE DE LA METHODE DE JAKES ET AL. (1968).	124
FIGURE II.1-10 : PRINCIPE DU DOSAGE COLORIMETRIQUE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE SMITH ET AL. (1985).	125
FIGURE II.1-11 : GAMME D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE SERUM BOVIN ET ZONE DE LINEARITE DE LA METHODE DE SMITH ET AL. (1985).	126
FIGURE II.1-12 : MECANISME GENERAL DE L'HYDROLYSE ACIDE DES GLYCOSIDES D'APRES BEMILLER (1967).	128
FIGURE II.1-13 : STABILITE DE LA LIAISON URONOSIDYLE A L'HYDROLYSE ACIDE D'APRES TIMELL ET AL. (1965).	128
FIGURE II.1-14 : REDUCTION DU 3,5-DINITROSALICYLATE AU COURS D'UN TRAITEMENT ALCALIN A CHAUD PAR DES GLUCIDES REDUCTEURS.	130
FIGURE II.1-15 : GAMME D'ETALONNAGE DU GLUCOSE ET ZONE DE LINEARITE DE LA METHODE AU 3,5-DNS.	131
FIGURE II.1-16 : GAMME D'ETALONNAGE DE DIFFERENTS POLYSACCHARIDES PAR GEL FILTRATION. COLONNE TSK-GEL G3000 PWXL-CP, CONDITIONS D'ANALYSE II.1.4.5.1.	134
FIGURE II.1-17 : SPECTRE CLHP DE QUELQUES UNS DES SUCRES UTILISES COMME STANDARDS D'ETALONNAGE. COLONNE ICSEP ORH-801, CONDITIONS D'ANALYSE II.1.4.5.2.	135
FIGURE II.1-18 : METHODE DE TRIMETHYLSILYLATION DES O-METHYLGLYCOSIDES D'APRES KAMERLING ET AL. (1975).	136
FIGURE II.1-19 : SPECTRE GC/MS DES SUCRES NEUTRES DERIVES, UTILISES COMME STANDARDS D'ETALONNAGE. EI 70eV, 40-650M/z, COLONNE DB-1701, CONDITIONS D'ANALYSE II.1.4.6.	138
FIGURE II.2-1 : ETATS FRAIS (GROSSISSEMENT x100) DE HAFNIA ALVEI (A), LACTOCOCCUS LACTIS (B) ET NAVICULA JEFFREYI (C). MICROSCOPIE OPTIQUE : LEITZ DMRB EQUIPEE D'UNE CAMERA LEICA DFC310 FX (LEICA, FRANCE).	142
FIGURE II.2-2 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL DU ZETAMETRE LASER ZETAPHOTOMETER II®.	149
FIGURE II.2-3 : APPAREILLAGE NECESSAIRE A LA PREPARATION DES TAPIS BACTERIENS, D'APRES VAN DER MEI ET AL. (1991).	151
FIGURE II.2-4 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TEST MATS PERMETTANT LA MESURE DE L'AFFINITE DE CELLULES MICROBIENNES POUR DIFFERENTS SOLVANTS D'APRES ALLION (2003).	153
FIGURE II.2-5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN MICROSCOPE DE FORCE ATOMIQUE D'APRES ALLION (2003).	154
FIGURE III.1-1 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MACRO-ALGUES SUR LES RENDEMENTS D'EXTRACTION DES POLYSACCHARIDES ET PROTEINES EXTRACELLULAIRES. CONDITIONS D'ETUDE SUIVANTES : TEMPERATURE D'EXTRACTION DE 40°C, DUREE D'EXTRACTION DE 24 H, CONCENTRATIONS EN MACRO-ALGUES VARIABLES (12, 25, 50 ET 100 G/L), EAU COMME SOLVANT D'EXTRACTION.	172

FIGURE III.1-2 : INFLUENCE DE LA DUREE D'EXTRACTION SUR LES QUANTITES DE POLYSACCHARIDES ET PROTEINES EXTRACELLULAIRES EXTRACTIBLES. CONDITIONS D'ETUDE SUIVANTES : TEMPERATURE D'EXTRACTION DE 40°C, DUREES D'EXTRACTION VARIABLES (0, 6, 12, 24, 36, 48 h), CONCENTRATION EN MACRO-ALGUES DE 25 G/L, EAU COMME SOLVANT D'EXTRACTION.	173
FIGURE III.1-3 : RENDEMENTS D'EXTRACTION DES FRACTIONS CHAET#1 ET CHAET#2 ENRICHIES EN POLYSACCHARIDES.	174
FIGURE III.1-4 : DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE DU POLYMERE COMPOSANT LA FRACTION CHAET #2 PAR CLHP . CONDITIONS D'ETUDE II.1.4.5.1.	176
FIGURE III.1-5 : SPECTRE INFRAROUGE DE LA FRACTION CHAET#2 ENRICHIE EN POLYSACCHARIDES.	177
FIGURE III.1-6 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE (XLSTAT) DES SPECTRES INFRAROUGES DE LA FRACTION CHAET#2 ET DE PLUSIEURS STANDARDS POLYSACCHARIDIQUES ET PROTEIQUES. REGION SPECTRALE (CM ⁻¹) SELECTIONNEE POUR L'ACP DE 650 A 4000 CM ⁻¹	178
FIGURE III.1-7 : MONOSACCHARIDES IDENTIFIES ET QUANTIFIES AU SEIN DE LA FRACTION CHAET#2 PAR CLHP. CONDITIONS D'ETUDE II.1.4.5.2.	179
FIGURE III.1-8 : SENSIBILITE DE LA SOUCHE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (ATCC 25923), APRES 24 H A 37°C, FACE A DIFFERENTS EXTRAITS DE CHAET#2 RESUSPENDUS, A HAUTEUR DE 50 G/L, DANS (A) DE L'EAU, (B) DE L'ETHANOL ABSOLU, (C) DE L'ACETONE ET (D) DU METHANOL. LES TESTS (B), (C) ET (D) ONT ETE REALISES SUR GELOSE GN. LE TEST (A) A ETE REALISE SUR GELOSE MH. T- REPRESENTE UN TEMOIN NEGATIF REALISE AVEC LE SOLVANT ADAPTE A L'EXTRAIT RESUSPENDU TESTE. T+ REPRESENTE UN TEMOIN POSITIF REPRESENTATIF DE LA SENSIBILITE DE LA SOUCHE (AMPICILLINE).	182
FIGURE III.1-9 : EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN CHL A AU COURS DE MAREES DIURNES (A) DANS LES PREMIERS 2 MM (B) ET 10 MM (C) DU SEDIMENT.	189
FIGURE III.1-10 : SCHEMA EXPLICATIF DES TESTS TEMOINS VISANT A PARTIELLEMENT DEFINIR L'INFLUENCE DU GASTEROPODE HYDROBIA ULVAE DANS LA SURESTIMATION DES QUANTITES DE SPE MICROPHYTOBENTHIQUES DU SEDIMENT INTERTIDAL CHARENTAIS.	191
FIGURE III.1-11 : DYNAMIQUES DE PRODUCTION DES GLUCIDES TOTAUX (µG GLC EQUIVS.µG CHL A ⁻¹) EXTRAITS DES FRACTIONS COLLOÏDALES (A), CAPSULAIRES (B) ET RESIDUELLES (C) AU COURS DE L'EMERSION DU SEDIMENT.....	195
FIGURE III.1-12 : COMPARAISON QUANTITATIVE ENTRE ACIDES URONIQUES ET SUCRES NEUTRES DES FRACTIONS GLUCIDIQUES TOTALES (µG GLC EQUIVS.µG CHL A ⁻¹), ET CE POUR LES FRACTIONS COLLOÏDALES (A) ET CAPSULAIRES (B) EN FONCTION DES PERIODES D'EMERSION.....	197
FIGURE III.1-13 : DISTRIBUTION EN BPM/HPM DES GLUCIDES TOTAUX ET ACIDES URONIQUES POUR LES FRACTIONS COLLOÏDALES (A) ET CAPSULAIRES (B) AU COURS DE L'EMERSION DU SEDIMENT.....	199
FIGURE III.1-14 : COMPOSITIONS DES FRACTIONS RESIDUELLES EN GLUCIDES TOTAUX (A), ACIDES URONIQUES (B) ET DISTRIBUTION EN BPM (C1) / HPM (C2) DE CES SUCRES AU COURS DE PERIODES D'EMERSION DU SEDIMENT.	202
FIGURE III.1-15 : COMPLEXITE DES FRACTIONS RESIDUELLES HPM : EVOLUTION DES CONCENTRATIONS EN GROUPEMENTS SULFATES (A) ET DES PROTEINES (B) AU SEIN DU SEDIMENT EN FONCTION DES PERIODES D'EMERSION.	204
FIGURE III.1-16 : COMPOSITIONS EN MONOSACCHARIDES (MOYENNEES A PARTIR DES TROIS SITES DE PRELEVEMENTS) DES DIFFERENTES FRACTIONS GLUCIDIQUES EXTRAITES DU SEDIMENT A DIFFERENTS TEMPS D'EMERSION. LA REPETABILITE ENTRE LES TRIPLICATAS SPATIAUX EST INFÉRIEURE A 5%. L'INCONNU INDIQUE LA SOMME DES TRACES N'AYANT PU ETRE IDENTIFIEES... 206	206

FIGURE III.1-17 : EVOLUTION DE LA DENSITE BACTERIENNE MESUREE AU SEIN DES DEUX PREMIERS MM D'UN SEDIMENT INTERTIDAL, AU COURS DE PHASES D'EMERSION.	212
FIGURE III.1-18 : HYPOTHESES DE LOCALISATION DES SPE EN FONCTION DE LEURS COMPOSITIONS ET STRUCTURES, BASEES SUR LE MODELE CONCEPTUEL DEVELOPEE PAR UNDERWOOD & PATERSON (2003) POUR LES EXOPOLYMERES DE DIATOMES BENTHIQUES. LES COMPOSITIONS EN GLUCIDES (%) SONT MOYENNEES SUR TOUTE LA DUREE DE L'EMERSION.	215
FIGURE III.2-1 : EVOLUTION DES CROISSANCES DE LACTOCOCCUS LACTIS (A), HAFNIA ALVEI (B) ET NAVICULA JEFFREYI (C) DANS LEURS MILIEUX DE CROISSANCE RESPECTIFS. LES CROISSANCES DES DEUX BACTERIES MODELES ONT ETE SUIVIES APRES LE TROISIEME REPIQUAGE (R3). LA CROISSANCE DE LA MICRO-ALGUE A ETE SUIVIE QUANT A ELLE EN CONTINU (AUCUNE PHASE DE REPIQUAGE).	218
FIGURE III.2-2 : PROPORTION DE BACTERIES NON REVIVIFIABLES APRES LYOPHILISATION DES ECHANTILLONS DE LACTOCOCCUS LACTIS (A) ET HAFNIA ALVEI (B).	220
FIGURE III.2-3 : SURFACES BACTERIENNES APRES LYOPHILISATION DE LACTOCOCCUS LACTIS (A), HAFNIA ALVEI (B) ET NAVICULA JEFFREYI (C1, C2) OBSERVEES PAR MEB.	221
FIGURE III.2-4 : MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES SOUCHES DE LACTOCOCCUS LACTIS (A) ET HAFNIA ALVEI (B) SUR UNE GAMME DE PH ALLANT DE 2 A 6, A TEMPERATURE AMBIANTE.	222
FIGURE III.2-5 : COMPOSITIONS MOLECULAIRES DE SURFACE DE LACTOCOCCUS LACTIS (A) ET HAFNIA ALVEI (B) OBTENUES PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER A TEMPERATURE AMBIANTE.	227
FIGURE III.2-6 : COMPOSITION MOLECULAIRE DE SURFACE DE NAVICULA JEFFREYI OBTENUE PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE A TRANSFORMEE DE FOURIER A TEMPERATURE AMBIANTE.	228
FIGURE III.2-7 : TAPIS BACTERIENS OBTENUS A PARTIR D'UN LYOPHILISAT DE LACTOCOCCUS LACTIS (A) ET D'UNE CULTURE FRAICHE DE LACTOCOCCUS LACTIS (B), AVEC (2) OU SANS (1) FILTRATION SOUS VIDE LEGER DES BACTERIES (PARAMETRES FIXES : CONCENTRATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE 2.10^9 CELLULES/ML, VOLUME FILTRE DE 40 ML ET TEMPS DE SECHAGE DE 60 MIN).	230
FIGURE III.2-8 : TAPIS BACTERIEN DE LACTOCOCCUS LACTIS DEPOSE SUR UNE LAME DE POLYSINE, OBSERVE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE (IMAGERIE LEICA DMLB, FOND NOIR, GROSSISSEMENT X10).	231
FIGURE III.2-9 : TAPIS BACTERIENS OBTENUS A PARTIR D'UN LYOPHILISAT D'HAFNIA ALVEI AVEC (B) OU SANS (A) FILTRATION SOUS VIDE LEGER (PARAMETRES FIXES : ETAT LYOPHILISE, CONCENTRATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE 2.10^9 CELLULES/ML, VOLUME FILTRE DE 40 ML ET TEMPS DE SECHAGE DE 60 MIN).	232
FIGURE III.2-10 : TAPIS BACTERIEN DE LACTOCOCCUS LACTIS. CONDITIONS FIXES : ETAT LYOPHILISE, TEMPS DE SECHAGE DE 60 MIN. CONDITIONS VARIABLES : (A) CONCENTRATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE 2.10^9 CELLULES/ML ET VOLUME FILTRE DE 80 ML ; (B) CONCENTRATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE DE 2.10^{10} CELLULES/ML ET VOLUME FILTRE DE 40ML.	233

FIGURE III.2-11 : EXEMPLES DE PROBLEMES RENCONTRES LORS DE LA MESURE DES ANGLES DE CONTACT FORMES ENTRE L'EAU ET DIFFERENTS TAPIS BACTERIENS DE LACTOCOCCUS LACTIS. LES TAPIS BACTERIENS A1 ET A2, ELABORES AVEC DE FAIBLES CONCENTRATIONS (4.10^8 CELLULES/ML) ET VOLUMES BACTERIENS (5 ML), METTENT EN EVIDENCE DES PROBLEMES COHESIFS (ABSORPTION) DES LE DEPOT DE LA GOUTTE D'EAU. LES TAPIS BACTERIENS B1 ET B2, PREPARES A PARTIR DE CONCENTRATIONS (2.10^{10} CELLULES/ML) ET VOLUMES BACTERIENS (80 ML) ELEVES, MONTRENT DES PERTURBATIONS COHESIVES DES LE DEPOT DE LA GOUTTE D'EAU PAR DETACHEMENT ET RESUSPENSION DU LIT. PARAMETRES FIXES : ETAT LYOPHILISE, TEMPS DE SECHAGE DE 60 MIN.	234
FIGURE III.2-12 : POURCENTAGES D’AFFINITE DE LACTOCOCCUS LACTIS (A) ET HAFNIA ALVEI (B) VIS-A-VIS DES COUPLES DE SOLVANTS : CHLOROFORME/HEXADECANE ET ACETATE D’ETHYLE/DECANE OBTENUS PAR LA METHODE MATS.	238
FIGURE III.2-13 : COMPARATIF SCHEMATIQUE DES CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES MODELES MESURES PAR DES METHODES CLASSIQUES D’ANALYSE DE PROPRIETES DE SURFACES MICROBIENNES.	241
FIGURE III.2-14 : ALLURES DES PICS CHROMATOGRAPHIQUES APRES RETENTION SUR UN LIT BACTERIEN DE RHIZOBIUM SP. DU 1,4-DIOXANE INJECTE A DES CONCENTRATIONS DE (A) $\frac{P}{P_0} = 0,05$ ET (B) $\frac{P}{P_0} = 0,025$. PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500 MG, RAPPORT DE DILUTION CELLULES/CHROMOSORB 1/1 (M/M).	245
FIGURE III.2-15 : PHOTOGRAPHIES OBTENUES PAR MEB DU (A, B) TEFLON ET DU (C, D) CHROMOSORB.	247
FIGURE III.2-16 : ENTHALPIES LIBRES D’ADSORPTION SPECIFIQUE ΔG_{ADS}^{SP} ET COMPOSANTES DISPERSIVES DE L’ENERGIE DE SURFACE γ_S^D , MESUREES PAR CGI, DU TEFLON ET DU CHROMOSORB.	248
FIGURE III.2-17 : EVOLUTION DES ENTHALPIES LIBRES D’ADSORPTION SPECIFIQUE DE CHAQUE SONDE POLAIRE EN FONCTION DU RAPPORT CELLULES BACTERIENNES/TEFLON UTILISE DANS L’ELABORATION DES LITS BACTERIENS DE LACTOCOCCUS LACTIS (A) ET HAFNIA ALVEI (B). PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500 MG, CONCENTRATION EN MOLECULES SONDES $\frac{P}{P_0} = 0,025$	250
FIGURE III.2-18 : PHOTOGRAPHIES OBTENUES PAR MEB DES RATIOS 1/5 (M/M) BACTERIES/SUPPORT : (A) LACTOCOCCUS LACTIS/TEFLON, (B) HAFNIA ALVEI/TEFLON, (C) LACTOCOCCUS LACTIS/CHROMOSORB ET (D) HAFNIA ALVEI/CHROMOSORB. LES FLECHES JAUNES CORRESPONDENT AUX TAPIS BACTERIENS. LES FLECHES ROUGES MONTRENT LE SUPPORT.	251
FIGURE III.2-19 : ENTHALPIES LIBRES D’ADSORPTION SPECIFIQUES DU TEFLON SEUL, DU MELANGE LACTOCOCCUS LACTIS/TEFLON ET DU MELANGE HAFNIA ALVEI/TEFLON MESUREES PAR CGI. PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500MG, RAPPORT DE DILUTION CELLULES/TEFLON 1/5 (M/M), CONCENTRATION EN MOLECULES SONDES $\frac{P}{P_0} = 0,025$	253
FIGURE III.2-20 : COMPOSANTES DISPERSIVES DE L’ENERGIE DE SURFACE DU CHROMOSORB SEUL, DU MELANGE LACTOCOCCUS LACTIS/TEFLON ET DU MELANGE HAFNIA ALVEI/TEFLON MESUREES PAR CGI. PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500 MG, RAPPORT DE DILUTION CELLULES/CHROMOSORB 1/5 (M/M), CONCENTRATION EN MOLECULES SONDES $\frac{P}{P_0} = 0,025$	254
FIGURE III.2-21 : ENTHALPIES LIBRES D’ADSORPTION SPECIFIQUES DU TEFLON SEUL ET DU MELANGE NAVICULA JEFFREYI/TEFLON MESUREES PAR CGI. PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500 MG, RAPPORT DE DILUTION CELLULES/TEFLON 1/5 (M/M), CONCENTRATION EN MOLECULES SONDES $\frac{P}{P_0} = 0,025$	256

FIGURE III.2-22 : COMPOSANTES DISPERSIVES DE L'ÉNERGIE DE SURFACE DU CHROMOSORB SEUL ET DU MELANGE NAVICULA JEFFREYI/TEFLON MESUREES PAR CGI. PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500 MG, RAPPORT DE DILUTION CELLULES/CHROMOSORB 1/5 (M/M), CONCENTRATION EN MOLECULES SONDÉS $\frac{P}{P_0} = 0,025$	257
FIGURE III.2-23 : COMPARATIF SCHEMATIQUE DES CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES « ADHERES » MESURES PAR CGI.	259
FIGURE III.2-24 : ENTHALPIES LIBRES D'ADSORPTION SPECIFIQUES ET COMPOSANTES DISPERSIVES DE L'ÉNERGIE DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES LIBRES LACTOCOCCUS LACTIS, HAFNIA ALVEI ET NAVICULA JEFFREYI MESUREES PAR CGI. PARAMETRES FIXES : MASSE DE CELLULES DE 100 MG, CONCENTRATION EN MOLECULES SONDÉS $\frac{P}{P_0} = 0,025$	264
FIGURE III.2-25 : COMPARATIF SCHEMATIQUE DES CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES « LIBRES » MESURES PAR CGI.	269
FIGURE ADD-1 : SUBSTANCES POLYMERIQUES OBSERVEES AU SEIN D'UN LYOPHILISAT DE NAVICULA JEFFREYI PAR MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (MODE CONTACT, FORCE CONSTANTE ET TRES FAIBLE).....	269

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.1-1 : CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES LIGNEES D'ALGUES, D'APRES DE REVIERS (2002).....	26
TABLEAU I.1-2 : PRINCIPAUX SUBSTITUANTS RENCONTRES AU SEIN DE POLYSACCHARIDES D'ORIGINE ALGALE.	32
TABLEAU I.1-3 : CONTENU EN PROTEINES DE DIFFERENTES ALGUES MARINES UTILISEES EN INDUSTRIES ALIMENTAIRES, D'APRES FLEURENCE (1999).	38
TABLEAU I.1-4 : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE DIFFERENTES ALGUES MARINES ET ALIMENTS TRADITIONNELS (EN G D'ACIDES AMINES / 100 G DE PROTEINES), D'APRES FLEURENCE (1999).	39
TABLEAU I.1-5 : COMPARAISON DES TENEURS NATURELLES EN LIPIDES DE DIFFERENTES MICRO-ALGUES.	40
TABLEAU I.2-1 : COMPOSITION CHIMIQUE DES PAROIS DES BACTERIES A COLORATION DE GRAM POSITIF OU NEGATIF, D'APRES LARPEMENT & LARPEMENT-GOURGAUD (1985).	59
TABLEAU I.2-2 : ATTRIBUTION DES BANDES IR COURAMMENT OBSERVEES DANS LES BIOFILMS, D'APRES BOUTALEB (2007).	89
TABLEAU I.2-3 : COMPOSANTES DE LIFSHITZ-VAN DER WAALS (γ^{LW}), ACCEPTEUR D'ELECTRONS (γ^+) ET DONNEUR D'ELECTRONS (γ^-) DE L'ENERGIE LIBRE DE SURFACE DES TROIS LIQUIDES UTILISES DANS LA METHODE DES ANGLES DE CONTACT.....	93
TABLEAU I.2-4 : COMPOSANTES DE LIFSHITZ-VAN DER WAALS (γ^{LW}), ACCEPTEUR D'ELECTRONS (γ^+) ET DONNEUR D'ELECTRONS (γ^-) DE L'ENERGIE LIBRE DE SURFACE DES TROIS LIQUIDES UTILISES POUR LE TEST MATS D'APRES BELLON-FONTAINE ET AL. (1996).	95
TABLEAU II.1-1 : FRACTIONS POLYMERIQUES COLLECTEES PAR L'UTILISATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DEVELOPPE PAR TAKAHASHI ET AL. (2009).	117
TABLEAU II.1-2 : SEUILS MINIMAUX DE DETECTION DES DIFFERENTES METHODES COLORIMETRIQUES UTILISEES AU COURS DE L'ETUDE.	119
TABLEAU II.1-3 : METHODE DE PREPARATION DU REACTIF DE TRAVAIL POUR LE DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE SMITH ET AL. (1985).....	125
TABLEAU II.1-4 : MASSE MOLECULAIRE (DA) DE STANDARDS GLUCIDIQUES COURAMMENT UTILISES EN GEL FILTRATION.	133
TABLEAU II.2-1 : PROPRIETES DES SONDAS UTILISEES EN CGI.....	157
TABLEAU II.2-2 : PROPRIETES DES NOUVELLES SONDAS POLAIRES UTILES A LA DETERMINATION DES ENERGIES DE SURFACE DE CELLULES BACTERIENNES PAR CGI.	165
TABLEAU III.1-1 : COMPOSITION GLOBALE (RENDEMENT MASSIQUE) DE L'ECHANTILLON NATUREL CHAET#0 ET DES FRACTIONS CHAET#1, CHAET#2 ENRICHIES EN POLYSACCHARIDES.	175
TABLEAU III.1-2 : IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES MONOSACCHARIDES COMPOSANT LA FRACTION CHAET #2 PAR CPG/SM. CONDITIONS D'ETUDE II.1.4.6.	179
TABLEAU III.1-3 : ACTIVITE ANTI-STAPHYLOCOCCUS AUREUS DU POLYMERE CHAET#2 EXTRAIT DE LA MACRO-ALGUE CHAETOMORPHA AEREA.....	183

TABLEAU III.1-4 : TROUBLES BACTERIENS DE LA SOUCHE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (ATCC 25923) VISIBLE APRES 24 H DE CULTURE A 37°C EN PRESENCE DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'EXTRAITS DE CHAET#2, PREALABLEMENT DILUE DANS DE L'EAU OU DU METHANOL.	183
TABLEAU III.1-5 COMPOSITION PARTIELLE ($\mu\text{G}\cdot\text{G}^{-1}$ DE SEDIMENT SEC) DU SEDIMENT DES VASIERES INTERTIDALES DE MARENNES-OLERON. SEULS LES SUCRES NEUTRES, ACIDES URONIQUES, GROUPEMENTS SULFATES ET PROTEINES ONT ETE ANALYSES ET SEPARES EN FONCTION DE LEURS FRACTIONS D'ORIGINE APRES EXTRACTION.	190
TABLEAU III.1-6 : DISTRIBUTION EN GLUCIDES DES DIFFERENTES FRACTIONS EXTRAITES DE SPE.	192
TABLEAU III.1-7 : ANALYSE D'EXTRAITS A PARTIR DE CELLULES DE DIATOMES FRAICHES ET LYOPHILISEES, D'APRES WIGGLESWORTH-COOKSEY ET AL. (2001).	196
TABLEAU III.2-1 : DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MASSIQUES DES LYOPHILISATS MICROBIENS.	219
TABLEAU III.2-2 : RECAPITULATIF DES TECHNIQUES CLASSIQUES EMPLOYEES DANS LA CARACTERISATION DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE SURFACE DE CELLULES BACTERIENNES AU COURS DE CETTE ETUDE, ADAPTEE DE VAN DER MEI ET AL. (1991).	223
TABLEAU III.2-3 : EVOLUTION DE L'INTENSITE DES BANDES MAJORITAIRES D'ABSORPTION PAR SPECTROMETRIE INFRAROUGE DE LACTOCOCCUS LACTIS ET HAFNIA ALVEI SUITE A L'ELEVATION DE LA TEMPERATURE D'ETUDE (4°C A 40°C). TOUTES LES BANDES D'ABSORPTIONS ONT ETE NORMALISEES EN RESPECTANT L'ELONGATION CH AUTOUR DE 2930 cm^{-1}	226
TABLEAU III.2-4 : DETERMINATION DES PARAMETRES OPTIMAUX NECESSAIRES A L'OBTENTION D'UN TAPIS BACTERIEN HOMOGENE PAR LA TECHNIQUE DES MEMBRANES DE FILTRATION.	229
TABLEAU III.2-5 : ENERGIES DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES LACTOCOCCUS LACTIS, HAFNIA ALVEI ET NAVICULA JEFFREYI, DETERMINEES PAR MESURES DES ANGLES DE CONTACT DE TAPIS BACTERIENS HOMOGENES ET COHESIFS. TOUTES LES MANIPULATIONS ONT ETE REALISEES EN TRIPLICATAS.	236
TABLEAU III.2-6 : MESURE DES COMPOSANTES DISPERSIVE ET SPECIFIQUE DE LA SURFACE DE RHIZOBIUM SP. A DEUX CONCENTRATIONS DIFFERENTES EN MOLECULES SONDES. PARAMETRES FIXES : MASSE DE LA PHASE STATIONNAIRE DE 500MG, RAPPORT DE DILUTION CELLULES/CHROMOSORB 1/1 (M/M).	244
TABLEAU III.2-7 : VARIATIONS DES COMPOSANTES DISPERSIVE ET SPECIFIQUE MESUREES EN FONCTION DE DIFFERENTES MASSES DE PHASES STATIONNAIRES, CONSTITUEES DE RHIZOBIUM SP. PARAMETRES FIXES : RAPPORT DE DILUTION CELLULES/CHROMOSORB 1/1 (M/M), CONCENTRATION EN MOLECULES SONDES $\frac{P}{P_0} = 0,025$	246
TABLEAU III.2-8 : COMPARAISON DES ENERGIES DE SURFACE DES MICRO-ORGANISMES LACTOCOCCUS LACTIS, HAFNIA ALVEI ET NAVICULA JEFFREYI DETERMINEES (1, 2) PAR CGI ET (3) MESURES D'ANGLES DE CONTACT. TOUTES LES MANIPULATIONS ONT ETE REALISEES EN TRIPLICATAS.	266

INTRODUCTION

Les premiers biofilms ont été observés au microscope au XVII^{ème} siècle sur la surface de dents humaines (Valt 2008). Pourtant, ce n'est qu'en 1978 que la première réelle définition des biofilms a été donnée grâce aux travaux de John William Costerton (Costerton *et al.* 1978). L'étude et la compréhension des biofilms depuis ces dernières décennies n'ont cessé d'évoluer et les auteurs s'entendent désormais à décrire les biofilms comme des consortia de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), immobilisés sur une surface et entourés d'une matrice adhésive protectrice, hautement hydratée, globalement anionique et constituée de Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) essentiellement polysaccharidiques (Lahaye 2006). L'enfouissement de cette communauté microbienne dans une matrice fibreuse de polymères permet la formation d'une structure tridimensionnelle complexe, fortement adhérente à la surface « contaminée » (métaux, plastiques, particules telluriques, tissus) (Characklis *et al.* 1989) et capable de nombreuses communications intercellulaires afin d'assurer la coopération des micro-organismes acteurs (Bosgraud *et al.* 2003). La formation d'un biofilm sur une surface est le résultat d'un ensemble de processus séquentiels physique, chimique et biologique complexes (Busscher 1995). L'adhésion primaire est considérée comme l'étape clé qui conditionne la formation des biofilms. Un certain nombre de domaines s'intéressent d'ailleurs à ce phénomène précurseur afin de prévenir ou lutter contre la colonisation des surfaces. L'industrie navale, par exemple, lutte continuellement contre la formation de bio-salissures sur les coques des navires et les structures portuaires. De manière générale, on considère que toutes les surfaces sont colonisables. Bien que certains matériaux retardent la prolifération des micro-organismes, la présence de biofilms est donc une source de problèmes majeurs à la fois multi-industriels, économiques, de santé et sociétaux (Valt 2008). Il est important de noter que de nombreux biofilms présentent cependant des intérêts majeurs, par exemple bénéfiques au bon fonctionnement d'écosystèmes complexes.

Les vasières intertidales, zones de transition entre le bassin versant et le domaine océanique, soumises aux flux des marées, sont des écosystèmes à forte productivité en matières organiques issues de la photosynthèse, souvent supérieure à celle observée dans des forêts tropicales.

Les biofilms benthiques, constitués à la fois de micro-algues comme les diatomées, de bactéries, de procaryotes et de matrices polymériques cohésives (SPE) (Flemming & Wingender 2002 ; Haynes *et al.* 2007 ; Fuhrman 2009), sont responsables de cette forte productivité primaire et secondaire essentielle à la biosphère et à l'écosystème marin.

Ces travaux s'inscrivent dans une thématique de recherche transdisciplinaire sur les biofilms, à l'origine d'une collaboration étroite entre biochimistes, microbiologistes et écologues, menée dans l'Unité Mixte de Recherche UMR 6250 CNRS-Université de La Rochelle : LIENSs Littoral ENvironnement et Sociétés de l'Université de La Rochelle.

Localement, les biofilms benthiques formés à la surface des vasières intertidales de Marennes-Oléron, sont couramment choisis comme modèles afin de comprendre leurs rôles dans cet écosystème et leur mécanisme de formation. Ce manuscrit décrit ainsi les premiers résultats obtenus concernant le déterminisme moléculaire de la formation des biofilms benthiques de la région.

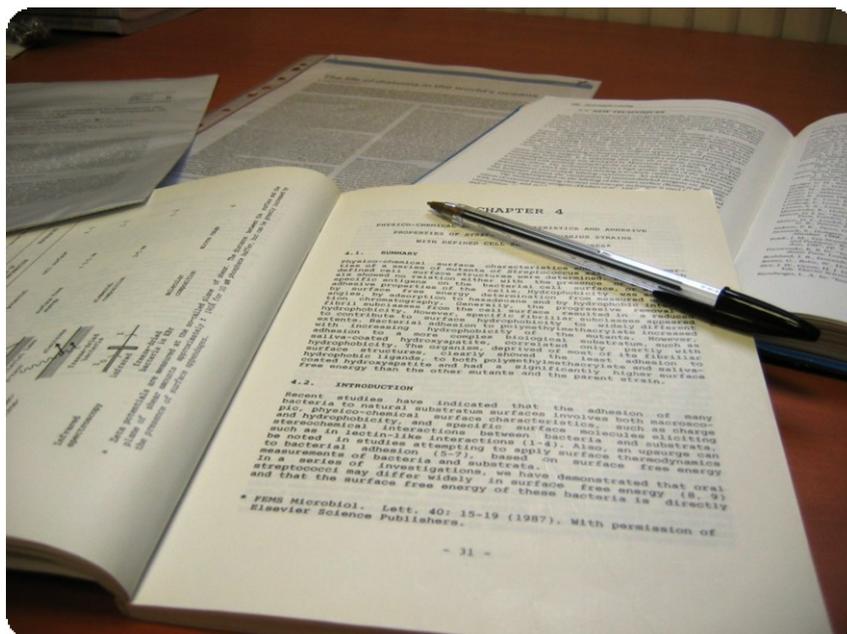
Au cours de cette recherche, des études biochimiques et écologiques ont été menées afin de corréliser la structure et la dynamique de production de ces SPE avec différentes conditions environnementales observées au sein des vasières charentaises. Le principal objectif de ce travail était de mieux comprendre l'importance de ces SPE dans la structuration et la formation des biofilms benthiques ; tout en s'inscrivant dans une conception plus globale des mécanismes écologiques impliqués dans le fonctionnement des vasières intertidales. La littérature ayant largement mis en évidence la difficulté pour extraire des quantités suffisantes de SPE et permettre leurs analyses, les protocoles biochimiques ont été, dans un premier temps mis au point sur une macro-algue, ces dernières étant connues pour leur composition riche en substances polymériques. L'algue verte *Chaetomorpha aerea*, largement disponible dans la région, a été choisie pour développer une partie de la méthodologie décrite dans ce manuscrit. Une étude préliminaire sur la composition de substances polymériques excrétées par l'algue a pu ainsi être menée en parallèle. Notons également que cette étude s'est inscrite dans une démarche potentielle de valorisation, cette macro-algue étant essentiellement connue pour son caractère délétère à l'activité ostréicole de Marennes-Oléron (Bouquet 2008).

Dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés spécifiquement aux phénomènes d'adhésion et de formation des biofilms benthiques. Pour cela, nous avons étudié le potentiel d'une nouvelle méthode, la Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI), comme méthode alternative à l'analyse des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes, en vue d'obtenir une meilleure compréhension des phénomènes précurseurs à la formation de biofilms. La comparaison des résultats obtenus par CGI avec ceux obtenus par des techniques classiques d'analyse des propriétés de surface de micro-organismes, comme la mesure d'angles de contact ou la méthode Microbial Adhesion to Solvents (MATS) (Bellon-Fontaine *et al.* 1996), a permis de juger du potentiel de cette méthode chromatographique originale. Initialement, cette partie du travail avait pour objectif de comprendre l'influence des micro-algues (*Navicula jeffreyi*, diatomée) et de leurs SPE dans la formation des biofilms benthiques, afin d'apporter à l'approche écologique des explications physico-chimiques de l'adhésion primaire et corrélérer la structure des SPE avec leurs fonctions dans la formation des biofilms. Toutefois, les mécanismes à l'origine de la formation des biofilms benthiques ne sont pas spécifiques à cet écosystème. Cette méthode pourrait donc être standardisée et appliquée à l'étude des propriétés de surface d'autres biofilms et micro-organismes.

L'ensemble de ce travail se décompose en trois temps. La première partie du manuscrit sera consacrée à une étude bibliographique décrivant les algues, leurs polymères et applications ainsi que leur importance dans les mécanismes d'adhésion microbienne, responsables de la formation des biofilms. L'état de l'art décrira également les mécanismes mis en jeu dans la formation des biofilms bactériens ou algaux, les méthodes classiques qui permettent l'analyse des propriétés de surface de micro-organismes et sera conclu par un descriptif du principe et de l'utilisation de la CGI dans cette étude. La seconde partie sera consacrée à la description du matériel et des méthodes développées pour mener à bien ce travail. La dernière partie du mémoire exposera les résultats obtenus au cours de cette thèse. Les résultats, concernant la purification et la détermination de la composition d'une SPE de la macro-algue *Chaetomorpha aerea* au cours de la mise au point des protocoles, seront d'abord abordés. Les résultats décrivant la dynamique et la composition de SPE benthiques en fonction des conditions environnementales observées au sein des vasières intertidales charentaises seront traités dans un deuxième temps, suivis de ceux visant à déterminer les propriétés de surface d'une micro-algue formatrice de biofilms benthiques, *Navicula jeffreyi*, par CGI.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I



Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

PARTIE I



Etude bibliographique

- I.1 - Les substances polymériques d'origine algale
 - I.1.1 - La matière première d'origine : les algues
 - I.1.2 - Les substances polymériques algales
 - I.1.3 - Rôles et enjeux des algues
 - I.1.4 - L'industrialisation des substances polymériques algales
 - I.1.5 - La compréhension fondamentale du rôle de ces substances polymériques dans différents contextes
- I.2 - Les biofilms microbiens
 - I.2.1 - Généralités
 - I.2.2 - Mécanismes de formation d'un biofilm
 - I.2.3 - Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion
 - I.2.4 - Phénomènes d'adsorption physico-chimiques à l'origine de l'adhésion primaire
 - I.2.5 - Méthodes classiques d'analyse des propriétés de surface de micro-organismes
 - I.2.6 - La Chromatographie Gazeuse Inverse : un nouvel outil pour l'analyse des propriétés globales de surface de micro-organismes

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 LES SUBSTANCES POLYMERIQUES D'ORIGINE ALGALE

I.1.1 La matière première d'origine : les algues

Organismes photosynthétiques, les algues sont conventionnellement définies comme des végétaux peuplant le milieu aquatique, les lieux humides et de nombreux milieux terrestres. On les rencontre aussi bien en eau de mer qu'en eau douce, sur les sols mouillés, sur diverses végétations, au sein de communautés symbiotiques (Hopkins 2003). Elles constituent une part non négligeable de la biodiversité. En 1994, 36 000 espèces étaient répertoriées et certaines projections estimaient que ces espèces ne représentaient que 17 % des 200 000 algues supposées existantes (Radmer & Parker 1994).

I.1.1.1 Classification des algues

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires, le mode de nutrition, l'habitat ou même la nature et la localisation des pigments et glucanes de réserve. Malgré cette importante diversité et complexité structurale, une dizaine d'embranchements¹ (Pérez 1997) permettent de classer ces végétaux. Différents critères rentrent en considération, à savoir leurs compositions pigmentaires, leurs caractéristiques structurales, leurs modes de reproduction ainsi que leurs polysaccharides de réserve (Tableau I.1-1).

L'équipement pigmentaire permet aux algues de capter l'énergie lumineuse de nombreuses longueurs d'onde. Ce processus bioénergétique, la photosynthèse, est à la base de leur autotrophie et leur permet de synthétiser de la matière organique. Cette caractéristique autotrophique s'applique essentiellement aux algues macroscopiques puisque que des études ont démontré que certaines algues microscopiques, telles que les diatomées (*Navicula*), étaient capable de se comporter en hétérotrophe. L'hétérotrophie existe toutefois chez certaines macro-algues rouges comme *Chondrus*, *Porphyra* et *Gracilaria* qui sont capables d'assimiler directement des composés organiques (Pérez 1997).

¹ En classification phylogénétique.

Tableau I.1-1 : Caractéristiques des principales lignées d'algues, d'après de Reviere (2002).

Embranchements	Caractéristiques		
	Types de Chlorophylle ^A	Phycobiliprotéines ^B	Polysaccharides de réserve ^C
<i>Bacillariophyta</i>	<i>a, c</i>	-	Chrysolaminarane
<i>Chlorophyta</i>	<i>a, b</i>	-	Amidon intraplastidial
<i>Chrysophyta</i>	<i>a, c</i>	-	Chrysolaminarane
<i>Cryptophyta</i>	<i>a, c</i>	PE	Amidon périplastidial
<i>Cyanophyta</i>	<i>a</i>	PC, PE	Glycogène
<i>Dinophyta</i>	<i>a, c</i>	-	Amidon cytoplasmique
<i>Euglenophyta</i>	<i>a, b</i>	-	Paramylon cytoplasmique
<i>Phaeophyta</i>	<i>a, c</i>	-	Laminarane, mannitol
<i>Rhodophyta</i>	<i>a, d</i>	PC, PE, APC	Amidon floridéen
<i>Xantophyta</i>	<i>a, c</i>	-	Chrysolaminaranes

PE : phycoérythrine

^A : cf. I.1.1.1.2.1, p. 26.

PC : phycocyanine

^B : cf. I.1.1.1.2.2, p. 27.

ACP : allophycocyanine

^C : cf. I.1.2.1.1.1, p. 32.

I.1.1.1.1 La pigmentation

La nature et la localisation des pigments permettent de définir plusieurs grands groupes d'algues (Lamouroux 1813 ; Kützing 1843 ; de Reviere 2002). Selon la nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle, la couleur des plastes des algues permet de distinguer les algues rouges (Rhodophytes), brunes (Chromophytes), vertes (Chlorophytes) et des bleues¹.

I.1.1.1.1.1 Les chlorophylles

Ces molécules sont impliquées dans les processus d'oxydoréduction photochimique des milieux biologiques. Elles assurent la collecte énergétique des photons et le transfert d'énergie indispensable à la transformation du dioxyde de carbone et de l'eau en composés organiques. Toutes les algues possèdent de la chlorophylle *a*.

¹ Communément connues sous le terme de cyanobactéries. Organismes unicellulaires dépourvus de noyaux différenciés (procaryotes) à l'inverse de toutes les autres algues (eucaryotes).

Malgré cette caractéristique commune, certains *phyla* se distinguent par la présence de chlorophylle *b* ou *d* (Figure I.1-1). Les algues vertes renferment, comme les plantes supérieures et contrairement aux autres algues, de la chlorophylle *b* tandis que les algues rouges possèdent en faible quantité de la chlorophylle *d* (Kornprobst 2005).

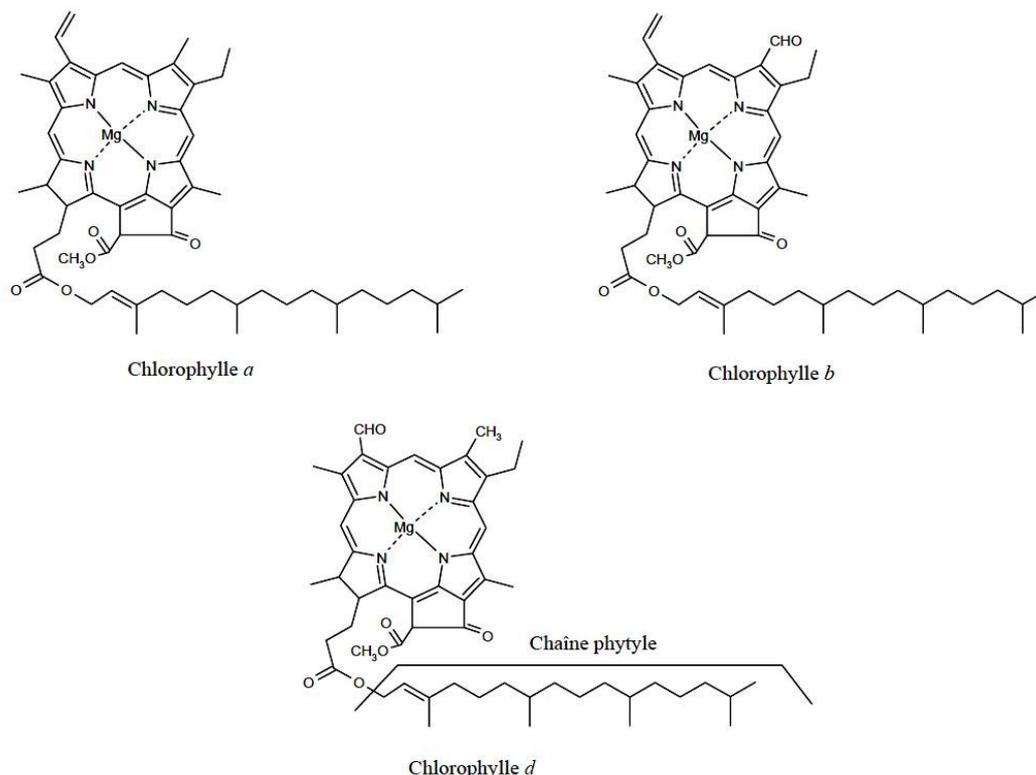


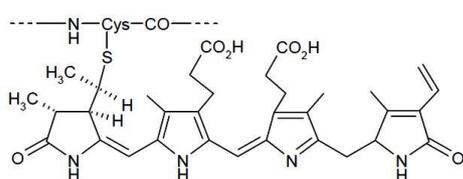
Figure I.1-1 : Structures des différentes chlorophylles.

I.1.1.1.2 Les phycobiliprotéines

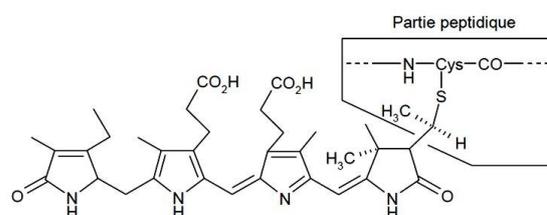
Les phycobilines ou phycobiliprotéines sont des molécules hydrosolubles d'environ 240 kDa, comportant une partie protéique liée de manière covalente à des chromophores ou bilines, couramment utilisés dans plusieurs applications biotechnologiques (Rossano *et al.* 2003). On distingue quatre sortes de phycobiliprotéines : trois interviennent dans la photosynthèse, et la quatrième, la phycochromobiline, est un récepteur important qui régule différents aspects de la croissance et du développement des algues (Hopkins 2003).

Les trois phycobilines qui interviennent dans la photosynthèse sont la phycoérythrine (rouge), la phycocyanine (bleue) et l'allophycocyanine (bleu turquoise) dont les chromophores¹ sont respectivement la phycoérythrobiline, la phycocyanobiline, et la phycourobiline (Figure I.1-2). Ces pigments peuvent coexister dans une même espèce, mais la phycoérythrine domine chez les Rhodophytes tandis que la phycocyanine est plus abondante et parfois seule chez les algues bleues (Cyanophytes).

Phycoérythrobiline liée à un peptide (couleur rouge)



Phycocyanobiline liée à un peptide (couleur bleue)



Phycourobiline liée à un peptide (couleur bleue turquoise)

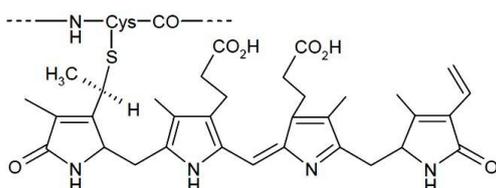


Figure I.1-2 : Structures des phycobilines.

1.1.1.1.3 Rôles fonctionnels de la pigmentation

La présence de certains pigments surnuméraires confère aux algues des propriétés particulières. Des antennes collectrices, complexes multi protéiques et pigmentaires, se chargent de capter l'énergie lumineuse en interceptant des photons de longueurs d'onde variables. La quantité de ces antennes varie en fonction de l'intensité lumineuse à laquelle sont exposées les cellules (Jahn *et al.* 1984). Lorsqu'un pigment absorbe un photon d'une longueur d'onde λ , un électron change d'orbitale moléculaire. Lorsque cet électron revient à son niveau initial d'énergie, il y a émission de fluorescence.

¹ Partie tétrapyrrolique de la molécule.

Les pigments sont organisés de telle sorte que l'énergie ne soit pas émise sous forme de fluorescence mais transmise à un autre pigment de l'antenne collectrice capable d'absorber de plus grandes longueurs d'onde (Figure I.1-3).

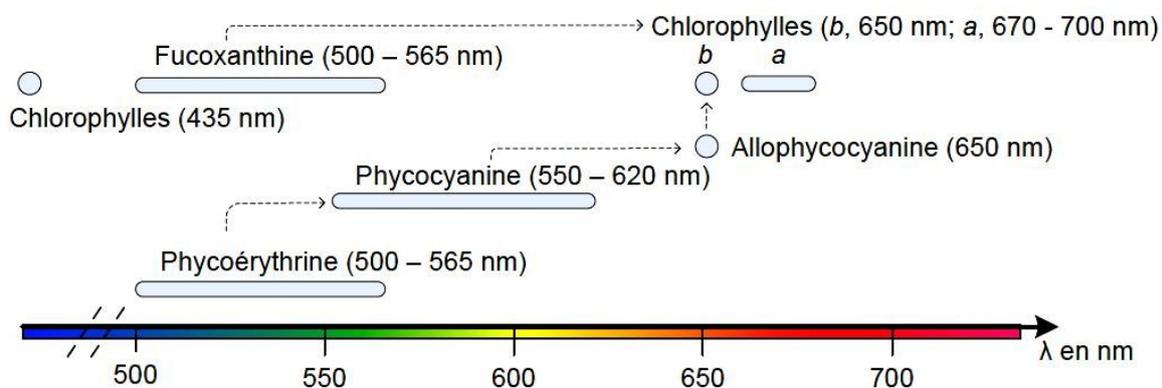


Figure I.1-3 : Trajet de l'énergie lumineuse dans les antennes collectives.

I.1.1.1.4 Classification pigmentaire des algues

La nature des pigments surnuméraires associés à la chlorophylle permet de distinguer :

- les Chlorophycées ou algues vertes, qui jouent un rôle important dans l'oxygénation des eaux. Elles sont de formes très variées, uni- ou pluricellulaires. Leurs plastes sont colorés en vert par les chlorophylles a et b, auxquelles sont associés carotènes et xanthophylles. La photosynthèse permet la formation d'amidon, comme pour les plantes supérieures. La plupart des algues vertes vivent en eau douce ou en milieu marins, mais certaines espèces peuvent également se développer sur terre (Pérez 1997),
- les Rhodophycées ou algues rouges. L'association de la phycoérythrine à d'autres pigments chlorophylliens est à l'origine de la coloration rosâtre des plastes de ces algues. Les Rhodophycées sont des organismes pluricellulaires d'origine marine¹ divisés en deux grands groupes, en fonction de leur cycle de reproduction : les Bangiophycées et les Floridéophycées,

¹ A quelques exceptions près, capables de vivre en eaux douces sous forme unicellulaire.

- les Phéophycées ou algues brunes. De structure généralement pluricellulaire et de dimensions très variables, la majorité de ces algues vivent en milieu marin et présentent une couleur brunâtre résultant de l'association de pigments dominants, à savoir la xanthophylle et la fucoxanthine.

I.1.1.2 Mode de reproduction

La reproduction des algues s'effectue classiquement par multiplication végétative. Il s'agit d'une multiplication asexuée qui consiste soit en une simple scissiparité de cellules isolées (cas des cyanobactéries), soit en une fragmentation de thalles aboutissant à la formation de plusieurs organismes identiques, via la formation de spores. Par ailleurs, les algues eucaryotes réalisent en plus une reproduction sexuée au cours de laquelle l'union de deux gamètes, produit un zygote (de Reviers 2002). Une alternance des phases de reproduction asexuée¹ et sexuée² permet ainsi la pérennité des algues. Enfin, il est important qu'aux cours des cycles d'alternance de génération plus ou moins variés (caractérisant leur reproduction), se superpose également une alternance de phases (de n à $2n$ chromosomes).

I.1.2 Les substances polymériques algales

De part leur taille, leur temps de génération et leur diversité, les algues constituent un vivier important pour de nouvelles applications scientifiques et économiques (Muller-Feuga 1997). Ces applications concernent le plus souvent l'extraction et l'utilisation de leurs polymères. Le concept de substances polymériques, macromolécules composées de polysaccharides (phycocolloïdes), de protéines, de lipides et de pigments prend réellement en considération la composition globale et la richesse variétale de ces biopolymères.

On considère que différentes catégories de biopolymères existent au sein des algues (macro- ou micro-), différenciées selon leur localisation, leur solubilité et leur composition. On distingue ainsi les polymères internes des polymères extracellulaires. Il est important à cette étape de signaler que nous avons considéré ces derniers comme des Substances Polymériques Extracellulaires (SPE). Ces substances polymériques sont différemment situées au sein des organismes étudiés et sont produites par des voies métaboliques variées.

¹ Assurée par les thalles (sporophytes).

² Assurée par les thalles producteurs (gamétophytes) de cellules reproductrices.

Faute de données structurales suffisantes permettant d'établir des corrélations entre structure et fonction, il est souvent difficile de valoriser ces molécules. Une synthèse bibliographique brève regroupant des données majeures sur les polysaccharides, protéines et lipides d'origine algale est décrite dans cette partie.

I.1.2.1 Fractions polysaccharidiques

Dans la nature, de nombreux types de polysaccharides, issus du règne végétal ou animal, ont été répertoriés. De part leurs applications pour l'homme, ces polymères ont été largement étudiés. Composés de résidus glycosidiques, pouvant être liés de façon covalente à des substituants organiques ou inorganiques, les polysaccharides constituent une catégorie de polymères très hétérogène, de part la taille des molécules ou la variabilité des résidus engagés. Chez les algues, il existe une grande variété d'unités saccharidiques, qu'elles soient neutres, acides ou aminées. Ces monosaccharides sont généralement présents sous forme de pyranose et adoptent la conformation de chaise, qui leur est plus favorable d'un point de vue énergétique (Lahaye 2001). La nomenclature divise les polysaccharides en deux classes, en fonction de la nature de leurs composants : les homo- et les hétéropolysaccharides. Les homopolysaccharides ne sont composés que de monosaccharides identiques. L'enchaînement des résidus et la présence de ramifications modifient leurs comportements en solution ainsi que leurs propriétés physico-chimiques. En général, l'utilisation de ces phycocolloïdes se réduit essentiellement à l'exploitation de leurs propriétés rhéologiques (Whistler & Bemiller 1993).

La majorité des polysaccharides d'origine algale correspond à des hétéropolysaccharides. Ils sont constitués d'unités répétitives comportant au moins deux résidus différents par unité, les unités pouvant être ramifiées. Ces hétéropolysaccharides peuvent contenir divers substituants liés par des liaisons éther, ester, amide, sulfate ou acétalique (Tableau I.1-2). Ces groupements sont en grande partie responsables des propriétés physico-chimiques des polymères qui les portent. De manière générale, les taux en sulfate des polysaccharides d'origine algale¹ sont plus importants que ceux rencontrés chez les bactéries (Percival & McDowell 1967 ; Chevlot *et al.* 2001). Les phosphates sont également considérés comme des substituants récurrents des hétéropolysaccharides d'origine algale.

¹ Les fucoïdanes par exemple.

Tableau I.1-2 : Principaux substituants rencontrés au sein de polysaccharides d'origine algale.

Origines du substituant	Natures du substituant	Structures	Natures de la liaison
Organique	O-Methyl	-OCH ₃	Ether
	Pyruvyl	-O[C(CH ₃)CO ₂ H]O-	Acétals
Inorganique	Sulfate hémierster	-OSO ₃ ⁻	Ester

On distingue différentes catégories de polysaccharides au sein des algues : les polysaccharides de réserve et les polysaccharides pariétaux, eux-mêmes différenciés selon leur localisation dans la phase fibrillaire ou matricielle.

1.1.2.1.1 Les polysaccharides de réserve

Il s'agit des polysaccharides qui résultent directement du mécanisme photosynthétique et qui sont stockés notamment dans les vacuoles des algues. Le type de stockage varie selon les espèces d'algues concernées (Tableau I.1-1). Chez les algues brunes, il s'agit d'un polymère de β -(1,3)-glucopyranose (laminarine), d'un polymère de α -(1,4)-glucose (amidon floridéen¹) chez les algues rouges et de glucane (polymère de β -(1,4)-glucose) et chez les algues vertes. Les mêmes types de stockage ont été observés chez les diatomées, micro-algues unicellulaires appartenant au phytoplancton (formes pélagiques) ou au microphytobenthos (formes benthiques) (Underwood & Paterson 2003).

1.1.2.1.2 Les polysaccharides pariétaux

La paroi des algues diffère significativement de celles des autres organismes végétaux par son organisation et sa composition. De nombreux auteurs considèrent cette dernière comme étant une structure biphasique composée d'une phase fibrillaire cristalline squelettique et d'une phase matricielle unique à l'algue². La nature chimique des colloïdes produits à la périphérie des cellules algales est d'ailleurs un critère de classification.

¹ Ne contient pas d'amylose.

² De part sa structure, sa composition.

1.1.2.1.1.2.1 La phase fibrillaire

Il s'agit d'une phase dite squelettique, constituée notamment de polysaccharides insolubles. Cette phase est ordonnée et enrobée dans une matrice amorphe mucilagineuse, l'espace intercellulaire étant occupé par ce même mucilage. Les microfibrilles sont généralement composées de β -(1,4)-glucopyranose qui forment (i) des chaînes cellulosiques arrangées en feuillets et stabilisées par des liaisons hydrogènes (Craigie 1990). D'autres polymères comme (ii) des xylanes et (iii) des mannanes participent, au même titre que la cellulose, à la structuration de la paroi cellulaire (Kloareg & Quatrano 1988).

(i) La cellulose compose significativement la paroi des algues vertes (jusqu'à 70 % en poids sec) contrairement aux algues brunes (< 20 % en poids sec) (Kloareg & Quatrano 1988) ou aux algues rouges (< 9 % en poids sec) (Preston 1974). Les chaînes individuelles de cellulose sont associées en microfibrilles¹, éléments structuraux de base de la paroi des algues (Chanzy 1990). Au sein des algues marines, la cellulose comporte généralement d'autres unités saccharidiques que le glucose, telle que le xylose ou le mannose.

(ii) Les xylanes squelettiques des parois cellulaires sont des polymères linéaires d'unité β -(1,3)-D-xylose ou β -(1,4)-D-xylose (Craigie 1990). Les premiers, qui forment des microfibrilles (Atkins & Parker 1969) ne sont présents que dans les algues dont la paroi cellulaire ne contient pas de cellulose (Iriki *et al.* 1960). Les β -(1,4) xylanes fibrillaires sont quant à eux surtout présents chez les algues vertes ou certaines algues rouges (*Porphyra*, *Bangia*).

(iii) Enfin, les mannanes sont des polymères linéaires formés d'unité β -(1,4)-D-mannose dont les chaînes s'associent entre elles pour former des microfibrilles (Kloareg & Quatrano 1988). On retrouve ces polymères chez les algues rouges et notamment chez les Bangiophycées (Gretz *et al.* 1982).

1.1.2.1.1.2.2 La phase matricielle ou amorphe

La phase matricielle hydrosoluble de nature mucilagineuse, parfois associée à des protéines, est de nature très complexe. A l'heure actuelle, de nombreux travaux ont rapporté l'impossibilité d'en rapporter la structure à une unité structurale plus ou moins répétitive.

¹ Par le biais de liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires.

Seuls certains galactanes d'algues rouges (agars, carraghénanes) ou polyosides d'algues brunes (fucoïdanes, alginates) d'intérêts économiques ont été caractérisés (Ruiz 2005). La nature des polysaccharides matriciels, noyés dans cette matrice où ont lieu les échanges cationiques, est spécifique à chaque type d'algue.

Les polysaccharides matriciels d'algues vertes

Chez les Chlorophycées, de nombreux travaux ont mis en évidence la prédominance d'hétéropolysaccharides ramifiés sulfatés au sein des polysaccharides matriciels (Percival 1979). Si l'on fait abstraction des groupements $-\text{OSO}_3^-$, ces hétéropolysaccharides ne sont pas fondamentalement différents des constituants matriciels des végétaux supérieurs (Robert & Catesson 2000). Trois groupes distincts ont été identifiés :

- les xyloarabinogalactanes sulfatés (17 % de sulfate), présents au sein des algues de l'ordre des Cladophorales et des Codiales. Aucune unité répétitive n'a été observée si ce n'est des portions comportant des blocs de (1,4)-L-arabinose, séparés par des unités de D-galactose. Toutes les unités de D-xylose et une partie des unités D-galactose sont en position terminale,
- les glucuronoxylorhamnanes sulfatés (22 % de sulfate) extraits des Ulvales (Figure I.1-4),
- les glucuronoxylorhamnogalactanes sulfatés (Figure I.1-4) et les rhamnogalactogalacturonanes, proches des acides pectiques des végétaux supérieurs, extraits des Ulvales (Ray & Lahaye 1995).

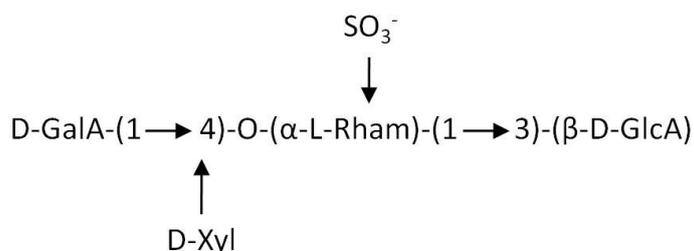


Figure I.1-4 : Exemple d'un glucuronoxylorhamnane sulfaté.

Les polysaccharides matriciels d'algues rouges

Les Rhodophycées sont une source industrielle connue de galactanes sulfatés aux propriétés gélifiantes et texturantes (Usov & Klochkova 1992), via l'extraction et la purification des carraghénanes et agarocolloïdes (Figure I.1-5).

Certains des groupements hydroxyle de ces galactopyranose peuvent être remplacés par des groupements sulfate, méthylé, pyruvate voir même substitués par un monosaccharide. De masses moléculaires importantes (> 1000 kDa), les carraghénanes (produits surtout par les Gigartinales) contiennent toujours plus de groupements sulfate que les agars¹ mais moins de substituants méthyle (Kloareg & Quatrano 1988 ; Craigie 1990 ; Usov 1998).

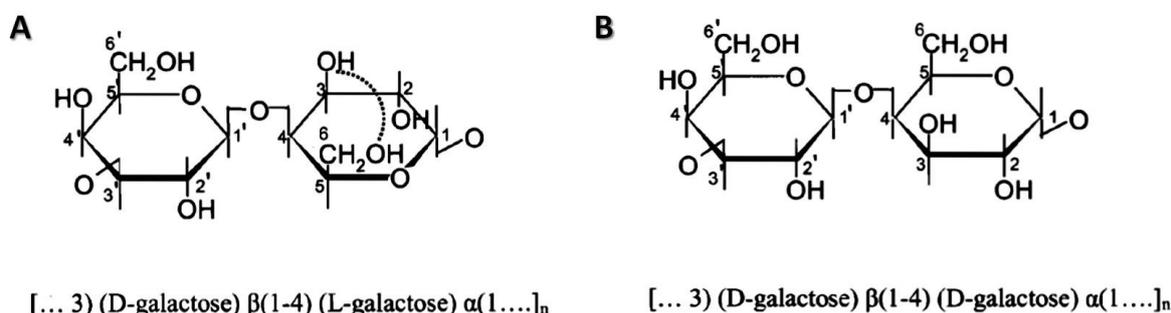


Figure I.1-5 Motifs osidiques de base des (A) agarocolloïdes et des (B) carraghénanes.

Les polysaccharides matriciels d'algues brunes

Trois principaux types de polysaccharides matriciels sont extraits des Phéophycées :

- les fucanes qui sont des hétéropolysaccharides dont les unités de base sont des résidus L-fucose liées en α-(1,2) et sulfatés en 4 (Figure I.1-6, A). Des résidus glycosidiques de galactose, xylose ou d'acides uroniques sont couramment rencontrés au sein des fucoïdanes (Percival 1979 ; Duarte *et al.* 2002),
- les ascophylanes, polysaccharides riches en acides uroniques et portant des ramifications de type xylose ou fucose (Percival 1979 ; Robert & Catesson 2000),

¹ 20 à 38 % contre 2 à 20 % de sulfates réciproquement chez les carraghénanes et les agars.

- les alginates (Figure I.1-6, B), qui représentent le mucilage matriciel majeur des algues brunes (Kloareg & Quatrano 1988). Extraits sous la forme d'acides alginiques, ils sont composés de deux unités monosaccharidiques, à savoir l'acide β -D-mannuronique et l'acide α -L-guluronique.

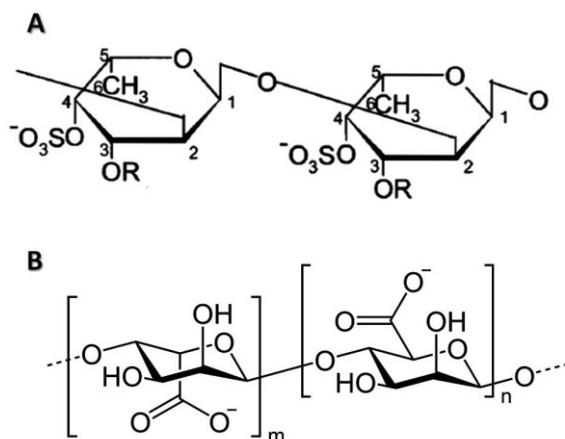


Figure I.1-6 : Structure primaire (A) des chaînes de fucose α -(1,2) des fucanes et (B) de l'alginate.

I.1.2.1.1.3 Influence et particularités de ces polysaccharides

L'assemblage des composants matriciels et squelettiques est fondé sur la constitution d'un réseau mais les modèles proposés restent relativement spéculatifs et anciens. La Figure I.1-7 présente la paroi des algues brunes, au sein de laquelle s'organisent polysaccharides fibrillaires et polysaccharides matriciaux.

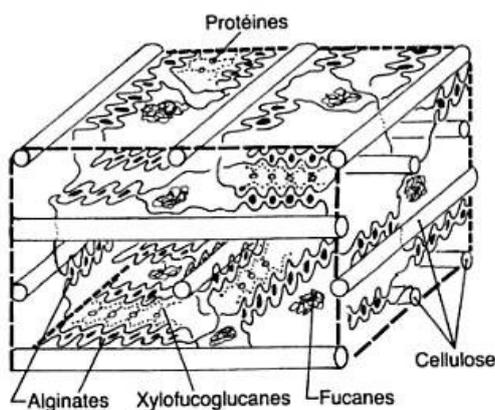


Figure I.1-7 : Modèle d'organisation de la paroi des algues brunes, d'après Kloareg et al. (1986).

L'organisation structurale de la paroi des algues diffère selon les groupes de végétaux marins et de leurs composants matriciels et fibrillaires. Cette organisation varie également au sein de la paroi : les microfibrilles sont plus nombreuses et disposées en plans successifs d'orientation à proximité de la membrane plasmique, alors que les composants matriciels sont les plus représentés dans la zone de jonction intercellulaire nommée matrice intercellulaire (Robert & Catesson 2000). La prédominance des mucilages sur les polysaccharides squelettiques, l'abondance de macromolécules sulfatées de caractère polyanionique, la présence d'une abondante matrice intercellulaire confèrent des propriétés particulières aux cellules algales :

- d'un point de vue niveau mécanique. La résistance à la déformation des thalles tient essentiellement aux liaisons établies entre les constituants de la matrice, alginates chez les Phéophycées et galactanes chez les Rhodophycées. Par ailleurs, certaines algues vertes et rouges améliorent l'élasticité et la rigidité de ces réseaux en incorporant du carbonate de calcium, associé à des carbonates de magnésium et de strontium,
- au niveau des échanges ioniques. En effet, les propriétés polyanioniques des constituants de la matrice permettent la captation de cations tels que Mg^{2+} , Ca^{2+} ou Na^+ ,
- au niveau des échanges aqueux. La présence de polysaccharides sulfatés favorise la rétention d'eau. Des algues implantées en zone intertidale (zone soumise à la marée) seront constitués de polysaccharides matriciaux plus complexes, rendant l'organisme capable de s'adapter aux périodes d'émersion plus ou moins longues (Spears *et al.* 2008).

I.1.2.2 Fractions protéiques

Les algues marines sont utilisées depuis des milliers d'années comme aliments pour les hommes et le bétail. De manière générale, la valorisation des algues est étroitement liée à la composition minérale de ces dernières (fer, calcium, magnésium) ainsi qu'aux propriétés fonctionnelles des polysaccharides qu'elles contiennent. Peu de travaux mettent en avant la valeur nutritionnelle des protéines d'origine algale (Fleurence 1999 ; Marfaing & Lerat 2007). Le taux de protéines chez les algues varie considérablement selon les espèces et des facteurs abiotiques comme la saison (Fleurence & Guéant 1999 ; Galland-Irmouli *et al.* 1999).

La fraction protéique des algues brunes est faible (3-15 % du poids sec), comparativement aux fractions protéiques des algues vertes ou rouges (10-47 % du poids sec) (Arasaki & Arasaki 1983 ; Rupérez & Saura-Calixto 2001).

Tableau I.1-3 : Contenu en protéines de différentes algues marines utilisées en industries alimentaires, d'après Fleurence (1999).

Contenu en protéines de différentes algues alimentaires.							
Espèces d'algues marines	<i>Palmaria palmata</i>	<i>Porphyra tenera</i>	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Ulva pertusa</i>	<i>Laminaria digitata</i>	<i>Fucus sp.</i>	<i>Ascophyllum nodosum</i>
Protéine (% en poids sec)	8-35	33-47	10-21	20-26	8-15	3-11	3-15

De nos jours, l'utilisation des protéines algales est plus fréquente au sein des industries alimentaires. La cyanobactérie *Arthrospira platensis*, est mondialement reconnue pour ses qualités nutritionnelles supérieures à la viande¹ et est préconisée dans la lutte contre la malnutrition sévère dans les pays en voie de développement. Cette cyanobactérie n'est toutefois pas la seule source de protéines d'origine algale. Certaines études ont mis en évidence la teneur élevée en protéines d'autres algues (Tableau I.1-3), protéines constituées d'ailleurs par des acides aminés essentiels. Ainsi, *Palmaria palmata* contient de la leucine, de la valine, de la méthionine et de l'acide aspartique tandis qu'*Ulva pertusa* présente une fraction protéique riche en histidine et en thréonine, à des taux comparables à l'ovalbumine (Tableau I.1-4).

¹ En termes de contenu protéique (environ 65 % en poids sec).

Tableau I.1-4 : Composition en acides aminés de différentes algues marines et aliments traditionnels (en g d'acides aminés / 100 g de protéines), d'après Fleurence (1999).

Acides aminés	<i>Ulva armoricana</i> (algue verte)	<i>Ulva pertusa</i> (algue verte)	<i>Palmaria palmata</i> (algue brune)	<i>Porphyra tenra</i> (algue brune)	Légumineux	Ovalbumine
Histidine	1,2-2,1	4,0	0,5-1,2	1,4	3,8-4,0	4,1
Isoleucine	2,3-3,6	3,5	3,5-3,7	4,0	3,6	4,8
Leucine	4,6-6,7	6,9	5,9-7,1	8,7	7,3	6,2
Lysine	3,-4,4	4,5	2,7-5,0	4,5	6,4-6,5	7,7
Méthionine	1,4-2,6	1,6	2,7-4,5	1,1	1,2-1,4	3,1
Phénylalanine	5,0-7,1	3,9	4,4-5,3	3,9	2,4	4,1
Thréonine	4,5-6,8	3,1	3,6-4,1	1,0	1,0	3,0
Tryptophane	-	0,3	3,0	1,3	1,6-1,9	1,0
Valine	4,0-5,2	4,9	5,1-6,9	6,4	4,5	5,4
Alanine	5,5-7,0	6,1	6,3-6,7	7,4	-	6,7
Arginine	4,3-8,7	14,9	4,6-5,1	16,4	13,0-14,0	11,7
Acide aspartique	6,0-11,8	6,5	8,5-18,5	7,0	4,7-5,4	6,2
Acide glutamique	11,7-23,4	6,9	6,7-9,9	7,2	6,4-6,7	9,9
Cystéine	-	-	-	-	1,1-1,3	-
Glycine	6,3-7,5	5,2	4,9-13,3	7,2	-	3,1
Proline	5,0-10,5	4,0	1,8-4,4	6,4	-	2,8
Sérine	5,6-6,1	3,0	4,0-6,2	2,9	-	6,8
Tyrosine	4,4-4,7	1,4	1,3-3,4	2,4	2,3-2,6	1,8

Globalement, la fraction protéique des algues est utilisée à but nutritif, l'algue étant consommée dans son ensemble, afin de profiter de ces fibres et oligo-éléments. Toutefois, certaines études ont montré que la digestibilité des protéines algales par l'homme ou par du bétail est loin d'être optimale (Indegaard & Minsaas 1991), souvent à cause de polysaccharides ou de groupements phénoliques présents. Des travaux s'intéressent ainsi à l'utilisation de prétraitements enzymatiques des algues afin d'éliminer les matières fibreuses¹ (Armano & Noda 1992) et améliorer la digestibilité des protéines.

I.1.2.3 Fractions lipidiques

Les micro-algues produisent, au niveau des chloroplastes, leur matière carbonée réduite par photosynthèse. La constitution d'une quantité de glycérate-3-phosphate permet à la cellule algale de biosynthétiser des sucres ou des lipides (voie de synthèse des triglycérides).

¹ Il s'agit de fibres solubles ou insolubles constituées de polysaccharides (agars, xylanes, carraghénanes, alginates).

En fonction des conditions environnementales, la voie de biosynthèse des triglycérides peut être favorisée, notamment en cas de carence en azote ou en silicium (diatomées). Classiquement, on considère que la teneur lipidique, notamment des macro-algues, est très faible : de 1 à 5 % de la matière sèche (Becker 1994 ; Marfaing & Lerat 2007). D'un point de vue qualitatif, les lipides algaux présentent une proportion en acide gras essentiels importante. Les algues rouges comme *Palmaria palmata*, *Porphyra sp.* contiennent par exemple des taux élevés d'acides gras polyinsaturés à 20 carbones comme l'acide gras eicosapentaénoïque (EPA) oméga 3 ($\omega 3 - C20 : 5$) ou l'acide arachidonique ($\omega 6 - 20 : 4$) (Darcy-Vrillon 1993).

Les micro-algues se distinguent des macro- par des teneurs en lipides plus importantes. Certaines d'entre elles sont capables d'accumuler jusqu'à 50 à 80 % de leur poids sec en lipides, bien que des teneurs comprises entre 20 et 50 % soient plus communes (Tableau I.1-5) (Bigogno & Khozin-Goldberg 2002 ; Chisti 2007). La micro-algue *Odontella aurita* est par exemple une source importante d'acides gras insaturés à longue chaîne : de 1,6 à 3,4 % (poids sec) d'acides gras EPA (Braud 1998). Par ailleurs, l'huile extraite ($\omega 3 - C22 : 6$) de *Schizochytrium* a été récemment autorisée en tant que nouvel ingrédient alimentaire (Marfaing & Lerat 2007). A l'heure actuelle, la richesse en lipides des micro-algues et leur relative facilitée de production font de ces dernières une source intéressante pour les secteurs de la pétrochimie afin de produire des biocarburants.

Tableau I.1-5 : Comparaison des teneurs naturelles en lipides de différentes micro-algues.

Micro-algues	Teneur en lipides (% m/m en poids sec)
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Chlorella sp.</i>	28-32
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>Isochrysis sp.</i>	25-33
<i>Nitzshia sp.</i>	45-47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20-30
<i>Tetraselmis sueica</i>	15-23

I.1.3 Rôles et enjeux des algues

I.1.3.1 Ecologie des algues : des organismes aquatiques essentiels à la vie sur Terre

Il convient de mettre l'accent sur le rôle fondamental joué par les végétaux aquatiques chlorophylliens dans le fonctionnement de la biosphère. A l'aube des temps, les cyanobactéries ont permis l'émergence de la vie aérobie et ont contribué à élever le pH de l'eau de mer en provoquant la formation de carbonate de calcium.

De manière générale, les espèces marines des phylums¹ chlorophylliens, réparties dans tous les océans (jusqu'à 150 m de profondeur), constituent une biomasse qui fournit plus de 70 % de la production annuelle d'oxygène, très loin devant les plantes continentales (1 % pour la forêt équatoriale) (John 1994 ; Pérez 1997).

Les algues représentent la plus importante machine de production de matières organiques, grâce à la photosynthèse, matières qui servent directement ou indirectement de base alimentaire aux êtres hétérotrophes². Les micro-algues benthiques sont un exemple flagrant de l'importance des algues en termes de production de matières organiques au sein des écosystèmes côtiers. Capables de former des biofilms benthiques complexes (Falciatore *et al.* 2000, Stoodley *et al.* 2002, Patil & Anil 2005), ces micro-algues (Bacillariophycées) sont à l'origine de la productivité primaire et secondaire importantes des vasières intertidales. De nombreuses études ont montré que les diatomées marines étaient essentielles à la qualité de l'environnement marin, notamment via leur production importante de matières organiques (Armbrust 2009).

Enfin, les champs sous-marins (macro-) constituent des habitats écologiques complexes qui participent à l'écosystème local (lieux de ponte, zones d'ombrage) mais aussi à la protection des côtes.

¹ Lignées génétiques complexes d'espèces vivantes.

² Ces derniers ne peuvent se nourrir que de matière organique déjà synthétisée, étant eux-mêmes incapables d'en produire à partir d'éléments simples (eau, gaz carbonique, sels minéraux).

I.1.3.2 Industrialisation des algues : des végétaux marins au service de l'activité humaine ?

Outre leur rôle systémique, les algues participent de manière non négligeable aux activités économiques mondiales. L'exploitation industrielle des algues est essentiellement liée à l'extraction de leurs phyco colloïdes¹, polysaccharides constituant la paroi des cellules, et autres substances polymériques. Ces substances polymériques sont principalement utilisées dans des domaines tels que l'agro-alimentaire, la cosmétologie ou la médecine (thérapie et prévention). Il est important de rappeler que l'industrialisation de ces végétaux marins découle également du besoin de lutter contre la « toxicité » de certaines algues et leur nuisibilité envers quelques activités humaines. Certaines micro-algues sont ainsi capables de rendre impropre à la consommation des produits de la pêche (Smayda 1997 ; Bouquet 2008). D'autres algues sont à l'origine de marées néfastes (prolifération active) pour l'écosystème atteint, ou de marées plus bénignes, ces dernières gênant surtout les activités balnéaires.

Dans ce sens, l'Etat Français tente de lutter contre les *blooms*² récurrents d'algues vertes (« marées vertes ») le long des zones côtières estuariennes peu profondes (Valiela *et al.* 1997). Les nuisances liées à la putréfaction de ces végétaux, d'ordre visuel et olfactif, affectent significativement l'activité touristique des sites atteints.

Par ailleurs, le dégagement d'hydrogène sulfuré et d'ammoniac est à l'origine de graves perturbations des faunes et flores locales. Les taux d'émission de ces composés dépassent parfois les normes définies par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et ont déjà été la cause d'accidents mortels. Le coût financier du ramassage quotidien des algues et de leur traitement (incinération) a mis en évidence l'importance d'un besoin de valorisation de ces dernières.

Localement, la filière ostréicole charentaise a constaté depuis les années 1990 une augmentation significative de la croissance des macro-algues (Chlorophycées dont *Chaetomorpha aerea* notamment) dans les marais salés où 60 000 T d'huitres creuses sont affinées chaque année (Bouquet 2008).

¹ « Phyco » pour algues et « colloïde » pour gélifiant.

² Ou prolifération active.

Ce dérèglement, lié à un rapport N/P (azote/phosphate) déséquilibré au sein des bassins, est à l'origine d'une eutrophisation du milieu, la biomasse phytoplanctonique diminuant drastiquement, entraînant par voie de conséquence une baisse de productivité importante des producteurs. Une valorisation économiquement viable pourrait permettre aux industriels d'appréhender au mieux la lutte contre ces macro-algues et leur permettre de dégager des bénéfices substantiels. Le concept de valorisation des algues, appliqué à différents domaines, sera discutée plus longuement en partie I.1.4.

I.1.3.3 Confrontation entre enjeux économiques et environnementaux

Au cours des temps, les hommes se sont surtout intéressés aux espèces végétales vivant sur les continents, essentiellement à cause de leur accessibilité. Les travaux récents s'entendent sur le fait que les végétaux aquatiques constituent un immense réservoir de molécules utilisables (Pérez 1997). Sur les 130 000 espèces recensées, à peine 700 ont été soumises à des études biochimiques poussées.

« Il reste beaucoup à faire dans ce domaine qui porte les espérances de demain » (Pérez 1997).

Si l'on considère un aspect purement fondamental ou des applications à visées thérapeutiques, cette volonté d'étudier et d'utiliser les algues paraît positive. L'étude de biomolécules extraites d'algues marines (*Constantinea simplex*) a permis de mettre en évidence une inhibition de la répllication des virus HSV (Herpes Simplex Virus) de type 1 et 2 (Richards *et al.* 1978 ; Santos *et al.* 1999). L'utilisation de molécules algales pour lutter contre le cancer est un autre exemple flagrant du potentiel de ces composés marins (Nakajima *et al.* 2009). En outre, le contenu exceptionnel en protéines, vitamines et oligo-éléments font des algues une source alimentaire non négligeable. La découverte en Corée de fragments d'algues au sein de repas fossilisés datant de 10 000 ans conduit à penser que ces végétaux ont été utilisés pendant des milliers d'années comme aliments. En 1997, on évaluait entre 4 g et 10 g / jour la quantité d'algues consommées au Japon, en Corée ou en Chine (Pérez 1997).

D'un autre côté, l'utilisation des algues (récoltées ou produites) dégage des chiffres d'affaire conséquents. En 2003, la FAO (Food and Agricultural Organization) déclarait des chiffres d'affaire supérieurs à 6 milliards de dollars, en considérant une optique d'utilisation purement alimentaire de ces dernières (Mc Hugh 2003).

A l'heure actuelle, de nouveaux acteurs s'intéressent à l'utilisation de ces algues, notamment pour générer des « biocarburants ». Diverses questions primordiales émergent alors :

- les enjeux économiques et politiques liés à l'utilisation des algues prendront-ils le dessus sur des recherches plus longues et plus coûteuses, à visée médicale notamment ?
- l'importance écologique des algues pour la planète sera-t-elle reléguée à un second plan, pour préférer les profits à court-terme ?

Plusieurs auteurs insistent déjà sur la nécessité de gérer au mieux la récolte *in situ* des algues valorisables afin de ne pas en épuiser les ressources et de ne pas modifier les différents écosystèmes qui dépendent de leur rôle systémique¹. La culture d'algues *in vitro*, intensive ou non, est l'un des moyens qui permettrait de répondre, au moins partiellement, à cette problématique liant étroitement les trois composantes suivantes : enjeux économiques, besoins humains et écosystème planétaire. Cependant, aucune étude très approfondie n'a été menée à l'heure actuelle concernant le possible impact environnemental de ces cultures intensives. Ces cultures *in vitro* nécessitent par ailleurs des apports importants en composés chimiques et « engrais », notamment pour empêcher la croissance d'autres micro-organismes qui envahissent les bassins de culture. Enfin, les procédés d'extraction et de fabrication de ces biocarburants sont relativement polluants.

Pour conclure, que peut-on penser de l'avenir de la lutte contre des algues invasives non valorisables face aux enjeux économiques de la pétrochimie ? Deux éléments de réponse peuvent déjà être avancés :

- à l'heure actuelle, l'Etat Français fournit des moyens insuffisants pour lutter contre la prolifération des Ulves² sur les côtes atlantique,
- les micro-algues représentent un rendement à l'hectare trente fois supérieur à celui des oléagineux utilisés pour la production de biodiesel...

¹ Théorie du chaos, adaptée aux notions de niches écologiques et de réseaux trophiques.

² Liée à de mauvaises pratiques agricoles. Leur prolifération est directement imputable à une activité humaine non adaptée. L'homme est donc responsable de cette pollution.

I.1.4 L'industrialisation des substances polymériques algales

Utilisées depuis des millénaires par les populations littorales pour leurs hautes valeurs nutritives, les algues constituent aujourd'hui un enjeu majeur de développement économique des industries agroalimentaires. La production annuelle globale d'algues marines était évaluée à 6.5×10^6 tonnes en 1994 par la Food Agriculture Organisation (FAO).

L'Asie représente le marché le plus large de commercialisation des algues en tant que végétaux directement consommables, et les japonais sont les premiers consommateurs de ces dérivés avec 1,6 kg (poids sec) par an et par personne (Bouglé 2007). Toutefois, l'industrialisation des algues ne passe pas forcément par une consommation de ces dernières. Les industries médicales et pharmaceutiques s'intéressent également à ces végétaux marins riches en molécules actives (Figure I.1-8). Cette partie présente quelques utilisations non exhaustives des algues marines.

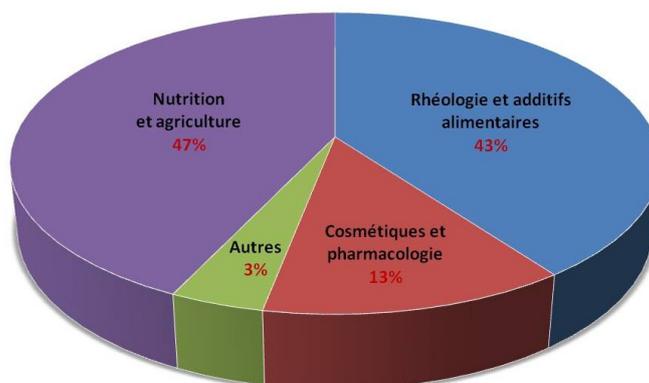


Figure I.1-8 : Modèle de répartition de l'utilisation des algues en 2001, adapté de Garon-Lardière (2004).

I.1.4.1 En agro-alimentaire

I.1.4.1.1 Propriétés rhéologiques

Une majorité des algues est consacrée à l'utilisation de leurs dérivés colloïdaux comme additifs alimentaires (Figure I.1-8). (i) Agar, (ii) alginate et (iii) carraghénane sont tous trois des dérivés d'algues et sont usuellement utilisés en industries agro-alimentaires (IAA) pour leurs propriétés rhéologiques significatives¹.

(i) L'agar est principalement extrait des Gracilariacées et Gelidiacées (Mc Hugh 2003). Il est utilisé en IAA comme additif (E 406) et son utilisation a considérablement augmenté depuis la crise de l'Encéphalite Spongiforme Bovine (ESB) qui a mis au ban les gélifiants d'origine animale. L'agar est retrouvé dans les bonbons, la confiture, le chocolat, les viandes en gelée, la charcuterie, les sauces, la purée de pomme de terres, les hamburgers, le fourrage des olives...

(ii) La plupart des macro-algues brunes contiennent de l'alginate dans leurs cellules pariétales. Ainsi, l'alginate leur confère une plus grande flexibilité, rendant possible leur prolifération dans des milieux turbulents. Les espèces les plus utilisées en IAA sont *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis* et *Sargassum* (Mc Hugh 2003). De même que pour l'agar, l'alginate est utilisé couramment comme additif (E400 à E404) et souvent retrouvé dans les mêmes produits alimentaires que l'agar.

(iii) *Kappaphycus alvarezii*, *Euचेuma denticulatum*, *Chondrus crispus* et *Gigartina stellata* sont les principales sources de carraghénanes. Quelques espèces d'algues sud américaines, dont l'algue *Betaphycus gelatinum*, sont également utilisées (Mc Hugh 2003). Les carraghénanes ont des propriétés gélifiantes, épaississantes et stabilisantes. Ils sont utilisés en IAA comme additif (E407) et sont retrouvés dans les desserts lactés, crèmes glacées, pâtisseries, shampoings...

¹ Effets gélifiant, stabilisant, et épaississant.

I.1.4.1.2 Alimentation animale et humaine

Il est difficile de définir l'intérêt nutritionnel des végétaux marins dans leur ensemble. Celui-ci dépend de l'espèce qui est consommée, chaque espèce présentant des compositions chimiques variées. Les algues sont en général riches :

- en sels minéraux (20 % du poids sec) comme le sodium, l'iode, le calcium, le potassium, le phosphore,
- en vitamines dont notamment la vitamine A et la vitamine C,
- en glucides (*cf. I.1.2.1, p. 31*),
- en protéines (*cf. I.1.2.2, p. 37*).

Actuellement, environ 145 de ces végétaux aquatiques entre dans la catégorie des algues alimentaires¹ (Zemke-White & Ohno 1999), 36 % appartiennent aux Chrysobiontes, 48 % aux Rhodobiontes, 15 % aux Chlorobiontes et 1 % aux Cyanobiontes (Figure I.1-9).

Enfin, trois types d'algues parmi ce panel couvrent à elles seules 99 % de la demande mondiale : les algues rouges *Porphyra*, la Chrysobionte *Laminaria japonica* et *Undaria pinnatifida*, plus communément connue sous la dénomination de Fougère de mer.

¹ Soit à peine 0,11 % des algues connues.

Espèces consommées	Pays consommateurs
<i>Laminaria japonica</i> (Kombu)	Chine, Japon, Corée, îles Sakaline, Russie
<i>Laminaria angustata</i> (Kombu)	Japon, Corée, USA
<i>Laminaria ochotensis</i> (Kombu)	USA
<i>Laminaria saccharina</i> (Tangle)	France, Grande-Bretagne
<i>Laminaria longicuris</i> (Kombu)	USA, Canada
<i>Laminaria longissima</i> (Kombu)	Japon, Corée, USA
<i>Laminaria hyperborea</i> (Kombu)	Europe, USA
<i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame ou fougère des mers)	Japon, Corée, Chine, Australie, Taïwan
<i>Hizikia fusiforme</i> (Hiziki ou Iziki)	Japon, Corée, USA
<i>Heterochordaria abietina</i>	Japon
<i>Fucus serratus</i> (Varech dentelé)	France
<i>Fucus vesiculosus</i> (Varech vésiculeux)	France
<i>Fucus spiralis</i> (Varech spiralé)	France
<i>Sargassum</i> sp (Limu-kala)	Polynésie, Hawaï
<i>Ascophyllum nodosum</i>	France
<i>Nemacystis depiciens</i>	Japon
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	USA
<i>Macrocystis pyrifera</i> (Giant kelp)	Nouvelle-Zélande, Argentine, Australie
<i>Durvillea antarctica</i> (Cochayuyo)	Chili
<i>Petalonia fascia</i>	USA
<i>Himantalia elongata</i> (haricot ou spaghetti de mer)	Europe
<i>Eisenia bicyclis</i> (Arame)	USA, Japon, Corée
<i>Alaria esculenta</i>	Europe, Japon
<i>Kjellmaniella gyrata</i>	USA
<i>Anilopus japonicus</i>	Japon
<i>Cladosiphon okamururus</i>	Japon
<i>Ecklonia kurome</i>	Corée, Japon
<i>Porphyra yesoensis</i> (Nori)	Japon, Corée, Chine, USA, nombreux pays
<i>Porphyra tenera</i> (Nori)	Japon, Corée, Chine, USA, nombreux pays
<i>Porphyra linearis</i> (faux Nori) <i>P. umbilicalis</i> (faux Nori)	France
<i>Porphyra dentata</i> (faux Nori)	Chili, Nouvelle-Zélande
<i>Porphyra crispata</i> (faux Nori)	USA
<i>Grateloupia filicina</i>	Japon, Corée
<i>Carpopeltis angusta</i>	Japon, Corée
<i>Palmaria palmata</i> (Dulse)	Europe
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Chili, Japon, Corée, Chine, Taïwan, Philippines
<i>Gracilaria coronopifolia</i>	Philippines, Indonésie
<i>Gracilaria salicornis</i>	Philippines, Indonésie
<i>Meristotheca</i>	Japon, Sénégal
<i>Chondrus crispus</i>	France, Grande-Bretagne, Argentine
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Argentine
<i>Gelidiella acerosa</i>	Philippines
<i>Laurencia obtusa</i>	Philippines
<i>Eucheuma denticulatum</i>	Philippines, Indonésie
<i>Gloiopeltis furcata</i>	USA
<i>Hypnea cervicornis</i>	Philippines
<i>Suhria vitata</i> (RedRibon)	Afrique australe
<i>Monostroma nitidum</i>	Japon
<i>Enteromorpha prolifera</i> , <i>E. Linza</i> (Ao Nori)	Japon, Corée, France, Philippines
<i>Ulva rigida</i>	Japon, Corée, France
<i>Codium</i> sp.	Philippines
<i>Caulerpa racemosa</i> , <i>C. taxifolia</i>	Philippines, Japon
<i>Caulerpa lentillifera</i> (Raisins de mer)	Philippines, Indonésie
<i>Caulerpa sertularioides</i> , <i>C. serrulata</i> , <i>C. clavifera</i>	Philippines, Indonésie
<i>Spirulina maxima</i>	Utilisation mondiale
<i>Spirulina platensis</i>	Utilisation mondiale

Figure I.1-9 : Végétaux marins consommés autrefois ou actuellement par l'homme, d'après Pérez (1997). La couleur de la bande centrale indique le phylum auquel appartiennent ces espèces.

Les algues sont également utilisées dans l'alimentation du bétail. Jadis consommées en l'état, elles sont désormais commercialisées sous forme de farines pour l'alimentation animale. *Ascophyllum nodosum* et *Laminaria digitata* sont couramment utilisées en Norvège, en Royaume-Uni ou en France (Mc Hugh 2003). La consommation d'algues par le bétail présente plusieurs avantages. Bozic *et al.* (2009) ont ainsi montré que l'addition de l'algue *Chaetoceros* à l'alimentation des ruminants abaissait significativement la production de méthane, gaz à effet de serre. Aux Etats Unis, 21% de la production de méthane provient de la fermentation entérique des ruminants. Par ailleurs, cette production fait perdre à l'organisme de l'animal 15% de son énergie.

I.1.4.2 En pharmacologie et médecine

Les algues représentent une source de substances polymériques actives, mise en évidence par de nombreux travaux de recherche. Les potentiels thérapeutiques de certaines de ces substances sont extrêmement prometteurs notamment comme agents antimicrobiens, agents antiviraux ou pour leurs activités envers certaines pathologies. Nakajima *et al.* (2009) ont ainsi mis en évidence un composé extrait d'une algue verte marine, le diméthylsulfoniopropionate, qui présente des potentialités anticancéreuses. Certains hétéropolysaccharides sulfatés matriciaux, comme les fucoïdanes, sont également appropriés pour lutter contre les processus de formation et de croissance de tumeurs malignes (Boisson-Vidal *et al.* 2007).

I.1.4.2.1 Extraits à activité antimicrobienne

Les algues, quelles soient macro- ou microscopiques, sont riches en molécules à activités antimicrobiennes. De nombreux travaux se sont intéressés à l'activité antimicrobienne d'extraits riches en différents polymères matriciels. Cependant, toutes ces approches ne caractérisent que l'activité de mélanges et non de molécules pures (Ktari *et al.* 2010). Dans ce sens, des études réalisées sur quatre espèces d'algues *Pterosiphonia complanata*, *Chondria dasyphylla* (algues rouges), *Spatoglossum schroederi* (algue brune) et *Enteromorpha compressa* (algue verte), ont montré que les différents extraits présentaient une activité significative à l'encontre de la souche *Staphylococcus aureus* (El Kouri *et al.* 2004).

Des extraits de l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia* présentent ainsi d'intéressantes activités antimicrobiennes vis-à-vis de certaines levures et moisissures comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* ou *Penicillium* (Souhaili *et al.* 2004). L'algue rouge *Ulva fasciata* et l'algue verte *Hypnea musciformis*, toutes deux collectés sur les côtes de l'océan indien, présentent de fortes activités bactériostatiques vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ou *Bacillus subtilis* (Selvin & Lipton 2004).

Plusieurs études ont également mis en évidence l'effet antimicrobien de molécules seules ou en mélange¹. Des extraits purifiés d'huiles, riches en β -phéllandrène et limonène, présentent des activités antimicrobiennes significatives contre des bactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* et *Bacillus subtilis*) et certains champignons (Al-Burtamani *et al.* 2005). Antoine *et al.* (2010) ont extrait cinq composés actifs à partir de l'algue *Helichrysum cameroonense*. Les auteurs ont identifié parmi ces extraits l'acide kaurénoïque, qui a montré une activité bactéricide envers *Bacillus megaterium*, ainsi qu'une nouvelle molécule inconnue, qu'ils ont caractérisée en tant que céramide (cameroonemide A). Enfin, certains travaux ont mis en évidence l'activité antibactérienne de diterpénoïdes extraits d'algues vertes (Chakraborty *et al.* 2010).

I.1.4.2.2 Extraits à activité antivirale

Les algues marines représentent également une source naturelle d'agents antiviraux (Ponce *et al.* 2003). Différents travaux de recherche ont permis de détecter des activités antivirales aussi bien chez des macro- que des micro-algues. Des études menées sur des extraits de l'algue *Laminaria abyssalis* ont permis d'identifier le caractère antiviral des échantillons à l'encontre du virus de l'herpes simplex (HSV) (Santos *et al.* 1999). Quelques décennies plus tôt, des extraits des algues *Constantinea simplex* et *Farlowia mollis*, avaient également présenté des activités antivirales similaires qui inhibaient la réplication des virus HSV de type 1 et 2 (Richards *et al.* 1978). Récemment, Abrantes *et al.* (2010) ont extrait et purifié, à partir d'algues brunes brésiliennes, plusieurs molécules inhibant la réplication du virus HSV de type 1, dont le diterpène 8,10,18-trihydroxy-2,6-dolabelladiène.

¹ Chacune des molécules présentes a été identifiée.

Mandal *et al.* (2007) avait mis en évidence l'activité anti-HSV d'un xylomannane sulfaté extrait de *Scinaia hatei*. D'autres travaux ont montré que des extraits, riches en lipides sulfatés (Gustafson 1989) ou en polysaccharides (Baba *et al.* 1990 ; Queiroz *et al.* 2008) de certaines algues présentaient d'intéressantes activités antivirales, en particulier vis-à-vis du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH 1).

I.1.4.2.3 Extraits à activité anti-thrombotique

Enfin, les algues marines sont une source de polysaccharides sulfatés présentant d'intéressantes propriétés anticoagulantes (Mao *et al.* 2005). Hayakawa *et al.* (2000) ont montré que huit polysaccharides sulfatés isolés de Chlorophycées étaient plus efficace que le dermatane sulfate, composé connu pour son activité anti-thrombotique. Les travaux de Yoon *et al.* (2007) ont comparé l'activité d'un polysaccharide sulfaté extrait de l'algue brune *Laminaria cichorioides* à celle de l'héparine, polysaccharide sulfaté classiquement choisi comme référence pour sa capacité à inhiber sélectivement la thrombine. Ces auteurs ont extrait un polymère similaire au fucane sulfaté, présentant une activité anticoagulante puissante. De manière générale, les fucoïdanes¹ présentent des intérêts médicaux reconnus pour leurs activités antithrombotiques et anticoagulantes (Mauray *et al.* 1995 ; Nardella *et al.* 1996 ; Collic-Jouault *et al.* 2001).

I.1.4.3 En cosmétologie

Les extraits d'algues sont régulièrement utilisés dans des crèmes cosmétologiques (Spolaore *et al.* 2006). Pour des raisons de formulation, on note que l'utilisation de poudres d'extraits d'algues est plus fréquente que l'utilisation des végétaux entiers. Certaines molécules d'origine algale sont même utilisées en tant qu'excipient dans l'élaboration de produits dermatologiques (alginates). De nombreuses recherches tendent à valoriser l'utilisation des algues, notamment à la vue des enjeux économiques considérables liées aux produits cosmétologiques d'appellation biologique (Dabouineau 2004). La fabrication de microbilles d'alginate, capables d'encapsuler des principes actifs et des colorants cosmétiques est un exemple flagrant du potentiel écosociétal des substances polymériques d'origine algale.

¹ Dont certains bactériens.

La Dermochlorine®, extrait obtenu par la société Codif¹ (St Malo, France) à partir de la micro-algue *Chlorella vulgaris*, permet de densifier et protéger le collagène et l'élastine du visage. Ce produit améliore par ailleurs la régénération des cellules du derme, le rendant incontournable dans des produits cosmétiques anti-rides.

Des études, menées sur des adipocytes de rats et d'humains, ont montré que des extraits concentrés aqueux (Phyco R75®) de l'algue *Laminaria digitata* permettaient de favoriser la lipolyse en stimulant l'adénosyl monophosphate cyclique (AMPC).

De récents travaux ont permis de purifier un extrait actif (HPS3®) issu de l'algue méditerranéenne *Padina pavonica*. Largement utilisé dans des crèmes anti-âges, cet extrait permet de stimuler la synthèse des glycosaminoglycanes (GAGs), molécules très hydrophiles qui constituent une partie du derme. Réservoir hydrique de la peau, les GAGs sont responsables des propriétés mécaniques² du derme. Avec l'âge, le contenu du derme en GAGs diminue, provoquant l'amincissement et le dessèchement de l'épiderme.

I.1.4.4 Autres applications

I.1.4.4.1 Génie des eaux : la purification des eaux usées

Brièvement, deux grands champs d'études se dégagent concernant l'application des algues dans le traitement des eaux usées (Mc Hugh 2003). Le premier concerne le traitement des eaux domestiques et de l'agriculture afin de diminuer la teneur totale en azote et en phosphore. Le deuxième champ relève de la capacité de certaines espèces d'algue, tel que *Chaetomorpha linum*, à détoxifier des eaux industrielles via la biosorption de métaux lourds (Chebil Ajjabia & Choubab 2009).

¹ <http://www.codif-recherche-et-nature.com/index.php>

² Souplesse, fermeté, élasticité.

I.1.4.4.2 Génie biochimique : les bioénergies

L'épuisement à moyen terme des ressources pétrolières encourage la recherche d'alternatives énergétiques durables. La production de biocarburants est depuis quelques années portée en avant. La deuxième génération de ces bio-composés s'est avéré un échec partiel, la principale critique avancée concernant la surface d'oléagineux cultivés nécessaire¹.

Si l'on considère le cas français, environ 120 % de la surface totale du pays serait nécessaire pour couvrir les besoins pétroliers annuels liés aux transports (environ 50M de tonnes) grâce à la culture de tournesols. Le même constat a été observé concernant la production de biocarburants (bioéthanol) à partir de végétaux (Danielo 2005). En outre, le développement de végétaux modifiés et les risques de conflits agro-économiques font de ces biocarburants de deuxième génération des alternatives de transition.

Actuellement, le potentiel de production de bioéthanol et de biodiesel à partir de cultures d'algues fait l'objet de nombreuses études (Demirbas 2010). Concernant la production d'acides gras, des résultats ont mis en évidence des rendements supérieurs de 80 % en faveur des cultures de micro-algues (Chisti 2007). La transestérification des acides gras² d'origine algale, présente plusieurs avantages notables, directement liés avec les différentes possibilités de croissance qui s'offrent à l'industriel. En bassin ou en bioréacteurs, le temps de génération des micro-algues est relativement court (de 3,5 à 48h). Les nutriments nécessaires sont peu onéreux et le lieu de culture n'est pas un facteur limitant³. Toutefois, les cultures nécessitent d'être contrôlées (nutriments disponibles, luminosité). De nombreux projets visent à mettre au point des systèmes optimaux de culture afin de limiter des problèmes de contaminations (fréquentes dans le cas de réacteur ouvert) et d'eutrophisation du milieu de culture due notamment aux métabolites relargués par les micro-algues. Le potentiel de certaines macro-algues a également été étudié.

¹ Et qui ne couvre qu'une partie des besoins énergétiques mondiaux.

² Qui permet la fabrication de bioéthanol.

³ Contrairement aux terres arables.

La production de biodiesel ne se limite pas à l'utilisation de micro-algues. Les travaux de d'Aresta *et al.* (2005) sur *Chaetomorpha linum* et *Pterocladia capillacea* ont mis en évidence des taux d'huile extractible variant de 7 à 20 % en fonction des conditions expérimentales. En outre, la fabrication d'éthanol (souvent bio) à partir de micro- ou macro- algues est toujours d'actualité et reste une deuxième voie de valorisation non négligeable (John *et al.* 2011).

I.1.5 La compréhension fondamentale du rôle de ces substances polymériques dans différents contextes

Outre leurs multiples applications directes, les substances polymériques d'origine algale ou bactérienne ont des rôles physiologiques très particuliers de part leurs propriétés et leurs dynamiques d'expression. Cette partie résume brièvement quelques uns des rôles systémiques de ces substances. La compréhension fondamentale des mécanismes biologiques et physico-chimiques mis en jeu via ces substances polymériques est de première importance afin de corréler structures et fonctions, notion indispensable à leur valorisation industrielle ou médicale.

I.1.5.1.1 En microbiologie

Les Substances Polymériques Extracellulaires sont considérées en microbiologie comme majoritairement polysaccharidiques. On parle alors d'ExoPolySaccharides (EPS). Cependant, il est important de noter que ces EPS sont régulièrement constitués de protéines ou de lipides (glycoprotéines et glycolipides). Les EPS sont présents chez de nombreuses espèces de bactéries provenant de diverses niches écologiques. Les propriétés de ces EPS, généralement sécrétés sous la forme d'une gangue mucilagineuse autour des bactéries, semblent importantes pour leur survie en milieu naturel. Les EPS influencent la manière dont les bactéries interagissent avec le milieu extérieur, qu'il soit liquide ou solide (Sutherland 1996). En milieu naturel, la majeure partie des bactéries s'adsorbe, sélectivement ou non, à des surfaces ou des organismes vivants. Lorsque cette surface appartient à un organisme vivant, il a été montré que les EPS jouaient un rôle de protection contre les surfactants, les anticorps et les macrophages (Schwarzmann & Boring 1971).

En dehors de son intervention dans l'adhésion¹, le glycocalyx occupe une place importante dans l'adaptation de la bactérie aux conditions physico-chimiques d'un environnement. Les EPS permettent aux bactéries d'agréger des particules en suspension en utilisant leur caractère anionique et leur capacité à chélater les métaux et les ions (Costerton *et al.* 1981). Les EPS jouent par ailleurs un rôle tampon et protecteur, notamment en cas de stress environnemental.

I.1.5.1.2 En écologie benthique

Les vasières intertidales sont assimilables à un système écologique complexe, étroitement impliquées dans un réseau trophique local aux répercussions mondiales. Ces dernières contribuent, de manière non négligeable, à la productivité primaire et secondaire des écosystèmes côtiers grâce à des processus physiques et biologiques complexes, impliquant notamment des micro-organismes unicellulaires. Le développement de modèles conceptuels visant à simplifier et comprendre les mécanismes impliqués a mis en évidence le rôle de certaines micro-algues telles que les diatomées⁽ⁱ⁾ (Guarini *et al.* 2000) et de bactéries⁽ⁱⁱ⁾ au sein du sédiment des vasières intertidales (Bellinger *et al.* 2009 ; Hofmann *et al.* 2009). La communauté microphytobenthique semble par ailleurs être majoritaire au sein de sédiments intertidaux européens (Admiraal 1984 ; Underwood *et al.* 1995 ; Underwood & Kromkamp 1999 ; Thornton *et al.* 2002).

⁽ⁱ⁾ Les diatomées ont été largement décrites dans de nombreuses études, plus ou moins récentes, et sont étroitement impliquées dans la formation de biofilms (Falciatore *et al.* 2000 ; Stoodley *et al.* 2002 ; Patil & Anil 2005). En effet, les diatomées marines sont essentielles à la qualité de l'environnement marin via leur production importante de matières organiques (Armbrust 2009). Ces dernières excrètent en particulier des Substances Polymériques Extracellulaires, impliquées en particulier dans leur système de motilité (Underwood *et al.* 2004). Cette matrice polymérique est composée d'une large variété de protéines, polysaccharides, lipides ou encore d'acides nucléiques (Wingender *et al.* 1999).

¹ L'importance de ces molécules dans la formation de biofilms bactériens et dans les phénomènes d'adhésion est largement explicitée par la suite en partie I.2.

De précédentes recherches ont montré que ces SPE pouvaient être utilisées comme source de carbone par la communauté bactérienne présente ainsi que par la macrofaune (van Duyl *et al.* 1999 ; Hanlon *et al.* 2006 ; Bellinger *et al.* 2009). Ces SPE affectent également le micro-environnement des biofilms benthiques en faisant varier des paramètres physico-chimiques tels que la porosité, la densité, l'hydrophobicité et la stabilité du sédiment (Flemming & Wingender 2002 ; Flemming *et al.* 2007). La composition des SPE a été corrélée à l'érosion du sédiment, ces dernières améliorant (Paterson & Black 1999) ou diminuant sa stabilité (Orvain *et al.* 2003).

(ii) D'un autre côté, les rôles des bactéries impliquées dans la formation de biofilms marins sont moins connus (O'Toole *et al.* 2000 ; Tolker-Nielsen & Moblin 2000 ; Stoodley *et al.* 2002 ; Hall-Stoodley *et al.* 2004).

Durant la dernière décennie, de nombreux travaux ont cherché à comprendre et définir l'implication de ces organismes dans la formation de biofilms (Decho 2000 ; Sutherland 2001 ; Fuhrman 2009). Dans ce sens, Flemming *et al.* (2007) a suggéré que ces SPE bactériennes faisaient partie intégrante de la matrice polymérique extracellulaire, tout comme les SPE microphytobenthiques.

La détermination des dynamiques de production de ces SPE pendant l'émergence *in situ* d'un sédiment pourrait permettre de mieux comprendre les phénomènes intervenant dans la formation d'un biofilm microphytobenthique. Par ailleurs, une connaissance plus juste de ces dynamiques pourrait significativement permettre une meilleure conception du réseau trophique local ainsi que l'influence physico-chimique de ces SPE sur l'écosystème côtier étudié, voire sur des écosystèmes côtiers similaires.

I.2 LES BIOFILMS MICROBIENS

Le premier biofilm a été observé au microscope au XVII^{ème} siècle lorsqu'Anthonie van Leeuwenhoek étudia des échantillons de la surface de dents humaines (Valt 2008). Le terme « biofilm » a été proposé dans les années 1980 par différents auteurs dont notamment Costerton *et al.* (1978). A l'époque, ces derniers avaient défini les biofilms comme étant des populations de bactéries, adhérant les unes aux autres et/ou à la surface de matériau. La définition du biofilm a évolué au cours du temps et représente à l'heure actuelle un consortium de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) entouré d'une matrice hautement hydratée, globalement anionique et constituée de Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) essentiellement polysaccharidiques (Lahaye 2006). L'enfouissement de cette communauté microbienne dans une matrice fibreuse de polymères extracellulaires permet la formation d'une structure tridimensionnelle complexe, fortement adhérente à la surface contaminée (métaux, plastiques, particules telluriques, tissus) (Characklis *et al.* 1989) capable de nombreuses communications intercellulaires afin d'assurer la coopération des micro-organismes acteurs (Bosgiraud *et al.* 2003).

I.2.1 Généralités

D'après des études menées par Jefferson (2004), diverses raisons poussent les micro-organismes à l'état planctonique à s'organiser sous la forme de biofilms. On considère que la formation d'un biofilm permet dans un premier temps d'accéder à des surfaces riches en nutriments. En outre, la conformation des surfaces et l'environnement favorisent la prolifération des espèces contaminantes. L'action et l'activité communautaire, issue de cette structuration complexe, permettent aux micro-organismes de s'adapter et de muter plus rapidement en fonction des besoins ou des stress environnementaux. Les bactéries incluses dans un biofilm peuvent présenter des caractéristiques microbiologiques très différentes de leurs homologues planctoniques. Il a ainsi été montré que la simple adhésion d'une bactérie sur une surface était à l'origine d'une modification plus ou moins importante de l'expression de ses gènes (Belas *et al.* 1986 ; Davies 1993). Enfin les micro-organismes devenus sessiles bénéficient d'une protection aux agressions extérieures par l'intermédiaire de la formation de gangues exopolysaccharidiques.

Cette protection rend d'ailleurs les biofilms extrêmement difficiles à éliminer et est à l'origine de nombreux problèmes, des domaines comme l'agro-alimentaire, l'industrie navale ou le domaine médical pouvant être incriminés.

I.2.1.1 Diversité des biofilms

Il existe une très grande variété de micro-organismes capables de former des biofilms en fonction de leur métabolisme, de leur forme ou du milieu. Une bonne connaissance de ces micro-organismes¹ est nécessaire à la compréhension des mécanismes à l'origine de la formation des biofilms. Procaryotes (bactéries) et eucaryotes (micro-algues², champignons³) présentent des caractéristiques propres à leur règne, à l'origine de leur capacité à former tel ou tel type de biofilm.

I.2.1.1.1 Les procaryotes : exemple des bactéries

Afin de comprendre les mécanismes d'adhésion mis en jeu lors de la formation de biofilms bactériens, il est important de considérer la structure de la paroi des cellules actrices. La paroi cellulaire constitue la structure vitale de la bactérie en assurant notamment la rigidité de cette dernière ; elle est aussi à l'origine de sa morphologie (Rubio 2002). Selon un critère purement morphologique, trois formes prédominantes sont observées dans la nature : (i) les bactéries sphériques ou coccoïdes, (ii) les bactéries cylindriques dites en bâtonnet et (iii) les bactéries spiralées. Par ailleurs, quelques variantes sont observées sous la forme de bactéries pédonculées, filamenteuses ou sporulées. Concernant leur rôle dans l'adhésion, les fonctions chimiques exposées à la surface des parois bactériennes déterminent les propriétés physico-chimiques extérieures apparentes de la bactérie. La présence d'appendices plus ou moins hydrophobes ou acides par exemple détermine la capacité de la bactérie à adhérer sur un type de surface. En milieu aqueux et pour une même souche bactérienne, de nombreuses études ont mis en évidence que ces caractéristiques de surface varient en fonction des propriétés du milieu (Rubio 2002 ; Hamadi 2005). En outre, la structure de la paroi et son organisation diffèrent selon l'appartenance du procaryote au groupe des bactéries à coloration de Gram positif ou négatif (Bosgiraud 2003).

¹ Caractéristiques énergétiques, composition de surface, métabolisme...

² *Navicula jeffreyi* par exemple, micro-algue majoritairement responsable dans la formation de biofilms benthiques.

³ *Candida albicans*, à l'origine de candidose humaine.

Le Tableau I.2-1 décrit brièvement quelques-unes des différences de composition chimique observées entre les parois de bactéries à coloration de Gram positif ou négatif.

Tableau I.2-1 : Composition chimique des parois des bactéries à coloration de Gram positif ou négatif, d'après Larpent & Larpent-Gourgaud (1985).

Caractéristiques	Gram⁺	Gram⁻
Mucopeptide	+	+
Polypeptide	+	+
Acide téichoïque	+	- (sauf <i>E.coli</i>)
Acides aminés	24-35 %	50 %
Protéines	+/-	+
Lipides	1 %	20 %
Lipopolysaccharides	-	+
Lipoprotéines	-	+

+ : présence

- : absence

I.2.1.1.1.1 La paroi des bactéries à coloration de Gram positif

La paroi des bactéries à coloration de Gram positif est principalement constituée d'une couche homogène de peptidoglycane¹ de 20 à 80 nm d'épaisseur située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique. Le peptidoglycane est formé de chaînes polysaccharides linéaires dont l'unité de base est une alternance régulière de sucres aminés, la N-acétylglucosamine (NAG) liée en β (1-4) à l'acide N-acétylmuramique (NAM) (Hancock 1991). De courtes chaînes peptidiques sont greffées au niveau des groupements carboxyle des unités NAM par une liaison amide.

Réseau maillé tridimensionnel rigide² et poreux, le peptidoglycane confère la morphologie et la rigidité des bactéries de ce type et représente environ 50 % du poids sec de la paroi cellulaire. En outre, différentes structures se greffent sur le peptidoglycane telles que des acides téichoïques, téichuroniques, lipotéichoïques. Ces composés jouent d'ailleurs des rôles majeurs dans l'adhésion des bactéries à l'origine de la formation de biofilms.

¹ Muréine ou mucopeptide.

² Les ponts interpeptidiques, reliant les chaînes térapeptidiques (différentes en fonction des espèces bactériennes) appartenant à des chaînes glycaniques adjacentes, sont à l'origine de cette rigidité.

Leur charge négative permet, entre autre, de maintenir et réguler la concentration en cations qui jouxte la paroi. Ils présentent également un rôle antigénique important.

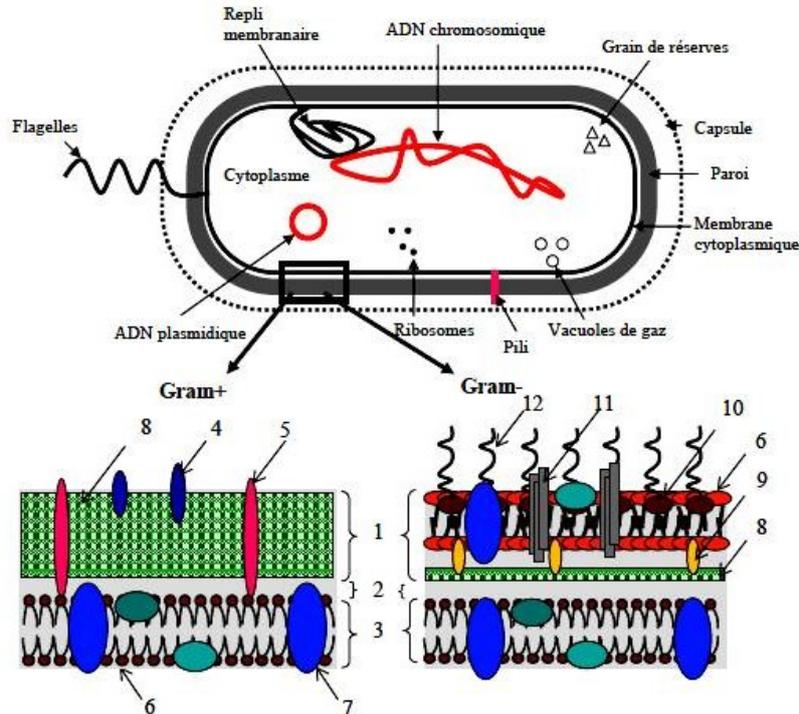


Figure I.2-1 : Représentation schématique d'une paroi des bactéries à coloration de Gram positif et négatif, d'après Boutaleb (2007). 1 : paroi, 2 : espace périplasmique, 3 : membrane plasmique, 4 : acide téichoïque, 5 : acide lipotéichoïque, 6 : phospholipide, 7 : protéine intrinsèque, 8 : peptidoglycane, 9 : lipoprotéines de Braun, 10 : lipopolysaccharides, 11 : porines, 12 : chaînes latérales antigéniques O.

I.2.1.1.1.2 La paroi des bactéries à coloration de Gram négatif

La paroi des bactéries à coloration de Gram négatif est généralement plus mince et constituée d'une couche de faible épaisseur de peptidoglycane (3 nm), entourée d'une membrane externe¹ de 7 à 8 nm d'épaisseur. Cette membrane est formée d'une double couche de phospholipides dans laquelle peuvent s'insérer des protéines, des lipoprotéines et des lipopolysaccharides (LPS) (Hancock 1991 ; Neidhardt *et al.* 1994). Une brève présentation des propriétés et structures des différents constituants (Figure I.2-1) de la paroi des bactéries à coloration de Gram négatif est présentée ci-après.

¹ La membrane externe est généralement asymétrique et joue un rôle important pour limiter l'entrée ou la sortie de divers constituants.

1.2.1.1.1.2.1 Protéines majeures (10⁵ unités par cellule bactérienne)

On distingue différents constituants majeurs qui répondent à la définition de protéines majeures (OMP¹) de la paroi des bactéries à coloration de Gram négatif : (i) les lipoprotéines de Braun, (ii) les protéines OmpA, (iii) les porines et les récepteurs protéiques membranaires du fer².

(i) La partie lipidique des protéines de Braun est enchâssée dans la face interne de la membrane externe par des liaisons hydrophobes avec les phospholipides. La partie protéique est liée de manière covalente au peptidoglycane entre les NH₂ de la lysine et les groupements carboxylique de l'acide amino-pimélique. Ces protéines assurent la liaison membrane externe-peptidoglycane ainsi que la cohésion structurale des enveloppes.

(ii) La protéine OmpA est impliquée dans la structuration de la membrane externe. Elle est nécessaire à l'entrée de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) par conjugaison mais ne participe cependant pas à la diffusion.

(iii) Constituées par l'assemblage de protéines sous forme de feuillet β , les porines forment des canaux hydrophiles qui traversent la membrane externe et forment des pores permettant aux molécules hydrophiles de petites tailles (<600 Da) de traverser.

1.2.1.1.1.2.2 Protéines mineures (100 unités par cellule bactérienne)

Les protéines mineures sont responsables du transport spécifique de petites molécules. Elles sont très variées mais exprimées dans des quantités moins importantes que les protéines majeures.

1.2.1.1.1.2.3 Les lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS sont des constituants retrouvés uniquement dans la couche externe de la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négatif (Figure I.2-1). Ils sont constitués de trois parties : (i) le lipide A situé du côté externe de la bicouche membranaire, (ii) le polysaccharide central et (iii) la chaîne antigénique O exposée à la surface des bactéries (Hancock 1991).

¹ Outer Membrane Proteins

² Ion regulated outer membrane proteins.

- (i) Le lipide A, partie lipophile des LPS, est composé de deux résidus glucosamine phosphorylés et acétylés sur toutes les fonctions hydroxyle et amine par des chaînes d'acides gras saturés.
- (ii) Il s'agit d'un oligosaccharide constitué par un noyau interne lié au lipide A et un noyau externe lié aux chaînes O spécifiques.
- (iii) Ces chaînes externes hydrophiles jouent un rôle antigénique très important et sont constituées d'un motif élémentaire de plusieurs sucres. En fonction des espèces bactériennes, leur composition varie. Ainsi, les souches qui possèdent des chaînes O complètes forment des colonies lisses. A l'inverse, les souches qui possèdent des chaînes O tronquées forment des colonies rugueuses.

1.2.1.1.3 Constituants communs aux bactéries à coloration de Gram positif et négatif

Hormis la couche plus ou moins épaisse et différemment constituée du peptidoglycane, certains constituants sont communs aux bactéries à coloration de Gram positif et négatif. De nombreuses bactéries possèdent une couche de polysaccharides plus ou moins épaisse et visqueuse qui recouvre la face extérieure de la paroi. La littérature sépare ces polysaccharides en deux types : on parle de capsule lorsque ces polysaccharides sont étroitement et fortement attachés à la paroi et de couches mucoïdes lorsque ces derniers sont facilement détachables de la surface (Figure I.2-1). De manière générale, cette couche de Substances Polymériques Extracellulaires est définie comme le glycocalyx. Les monosaccharides les plus rencontrés dans sa composition sont le fucose, le rhamnose, le glucose, le galactose et leurs formes aminées. La présence d'acides uronique et sialique n'est pas non plus négligeable. Ces SPE confèrent par ailleurs de nombreuses propriétés aux bactéries : résistance à l'attaque phagique ou à la phagocytose, résistance aux stress environnementaux, protection vis-à-vis de la dessiccation, source de nutriments en cas de carence (Allion 2003 ; Boutaleb 2007).

La couche S, constituée de protéines glycosylées ou non, est différemment située selon le type de bactéries (Figure I.2-1). Pour les bactéries à coloration de Gram positif, la couche S est localisée à la périphérie du peptidoglycane.

Pour les bactéries à coloration de Gram négatif, cette dernière est étroitement associée à la membrane externe. La couche S joue un rôle dans l'adhésion des bactéries aux surfaces inertes (Oliveira 1992). La couche S retient un certain nombre d'exoenzymes qui agissent, à la surface de la bactérie, sur le métabolisme des SPE par exemple.

Pour finir, on distingue des appendices cellulaires au sein des bactéries à coloration de Gram positif et négatif : les flagelles, les *pili* et les *fimbriae* (Figure I.2-1). Les flagelles sont des structures fines de nature protéique, qui confère à la bactérie sa mobilité. Les *pili* jouent quant à eux un rôle dans la conjugaison (échange d'informations génétiques entre deux bactéries). Enfin, les *fimbriae* sont impliqués dans les phénomènes d'adhésion. On considère que les différents appendices cellulaires de surface peuvent en pénétrant la paroi cellulaire perturber l'organisation du système et être à l'origine de surfaces exposées plus hydrophobes (Hancock 1991 ; Latrache *et al.* 1994). Ils permettent également le passage du minimum secondaire évoqué dans la théorie de la DLVO¹ décrite par la suite (*cf.* I.2.3.3, p. 72), indispensable aux interactions entre bactéries et surfaces contaminées.

I.2.1.1.2 Les Eucaryotes : exemple des micro-algues

Les Bacillariophycées, appelées plus communément diatomées sont des micro-organismes unicellulaires appartenant aux algues brunes. Leur taille varie de 20 à 200 μm en général avec quelques maxima à 2 mm. On distingue classiquement les formes pélagiques (appartenant au phytoplancton) des formes benthiques (appartenant au microphytobenthos). Les diatomées constituent une partie majeure du phytoplancton et jouent un rôle primordial au sein des écosystèmes marins et côtiers. Sous forme de cellules isolées ou regroupées en colonies, elles se caractérisent par une paroi rigide faite de silice hydratée insérée dans une matrice organique (frustule). Cette paroi est divisée en deux valves emboîtées de tailles différentes : l'*hypothèque* vient s'emboîter dans l'*épithèque*, la bordure verticale de l'*épithèque* (ou *épicingulum*) recouvrant le bord de l'*hypothèque* (ou *hypocingulum*). Chez de nombreuses espèces, ces deux valves présentent de multiples ornements différents et permettent d'identifier de nombreux individus. Les diatomées occupent à l'heure actuelle la zone photique des eaux marines fraîches et froides, mais aussi des eaux douces et des sols. En milieu marin, de nombreuses espèces planctoniques et benthiques ont déjà été identifiées.

¹ Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek.

Classiquement, on distingue deux catégories de diatomées, selon la géométrie de leur frustule :

- les diatomées centrales, à symétrie radiale : le frustule circulaire porte des stries, rayonnant depuis un point ou une aréole,
- les diatomées pennales, à symétrie bilatérale : le frustule allongé présente des stries disposées autour d'un plan de symétrie bilatérale.

De nombreuses diatomées pennales présentent une fente, appelée raphé, interrompue par un nodule central de silice. Ce raphé est à l'origine de la communication avec le milieu extérieur et de l'excrétion de mucilage (composés polysaccharidiques). La formation de gangues polymériques autour des diatomées va leur conférer des propriétés particulières d'adhésion, fonction de la composition de ces SPE. Les diatomées sont capables de moduler la composition de ces exopolymères pendant la formation des biofilms benthiques et des besoins structuraux ou environnementaux. En outre, ces micro-algues peuvent également produire des lipides et acides gras, qui influencent l'hydrophobicité de leur surface.

I.2.1.2 Rôles et enjeux des biofilms

Dans l'ensemble, on considère que toutes les surfaces sont colonisables. Bien que certains matériaux retardent la prolifération des micro-organismes, la présence de biofilms est couramment identifiée comme une source de problèmes à la fois industriels, économiques, de santé et sociétaux (Valt 2008). L'industrie navale doit par exemple continuellement lutter contre la formation de bio-salissures sur les coques des navires et les structures portuaires, associée à des problèmes de corrosion (Langumier 2009). Des études menées en milieu hospitalier ont mis en évidence que 5 à 10 % des malades contractent une infection au sein même des hôpitaux (maladies nosocomiales). 60 % de ces infections sont dues à la présence de biofilms. Lutter contre la formation des biofilms est donc de première nécessité et implique de nombreuses études fondamentales afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'adhésion de micro-organismes sur des surfaces. De plus, la présence de matrices exopolysaccharidiques (glycocalyx) empêche souvent l'utilisation d'antibiotiques, ces derniers ne pouvant pas convenablement pénétrer la structure tridimensionnelle complexe et cohésive formée par ces consortia de micro-organismes.

Plusieurs approches de traitement tendent soit à éliminer le biofilm après sa formation, soit à empêcher les premiers stades de formation du biofilm.

Si les biofilms sont une source de contamination dans les secteurs tels que l'agro-alimentaire ou les domaines médicaux, ils peuvent également être recherchés et utilisés positivement, comme pour le bio-traitement des eaux usées. L'utilisation de biofilms est également courante en digestion anaérobie (méthanisation) ou dans la formation de produits alimentaires fermentés tels que les fromages.

I.2.2 Mécanismes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm sur une surface est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique complexes (Busscher 1995). De manière générale, les différents types d'interaction matériau/surface microbienne, qu'elles soient spécifiques ou non, résultent des mêmes interactions physico-chimiques fondamentales. Dans l'approche physico-chimique « pure », on ne dissocie pas le vivant des autres matériaux. Les cellules microbiennes sont comparables à des particules colloïdales idéales, sphériques, relativement rigides, de surface définie et uniforme. Toutefois, la littérature actuelle tend désormais à considérer les cellules microbiennes comme des particules colloïdales beaucoup plus complexes, en prenant en considération les spécificités de chaque micro-organisme, dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de leur adhésion.

L'adhésion d'un micro-organisme sur une surface solide est donc un processus complexe qui implique deux surfaces dont l'une au moins est de nature « biologique ». Cette adhésion dépend de nombreux paramètres dont, par exemple :

- l'environnement (température, pH),
- la force ionique du milieu qui joue sur les charges de surface du micro-organisme et de la surface colonisée,
- la topographie de la surface,
- la présence de structures ou appendices actifs à la surface du micro-organisme et/ou du matériau,
- le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface contaminée ou du micro-organisme.

L'adhésion d'un micro-organisme sur un matériau répond à un même processus séquentiel qui repose sur différentes étapes, dont le nombre varie selon les auteurs. Trois étapes majeures décrivent le phénomène mis en jeu : (i) l'étape d'adhésion initiale des micro-organismes sur un matériau, (ii) l'étape de consolidation, (iii) l'étape de colonisation de la surface. En fonction des travaux, on distingue parfois deux phases au sein de l'adhésion initiale : l'étape de transport et la phase d'adhésion initiale proprement dite (Figure I.2-2).

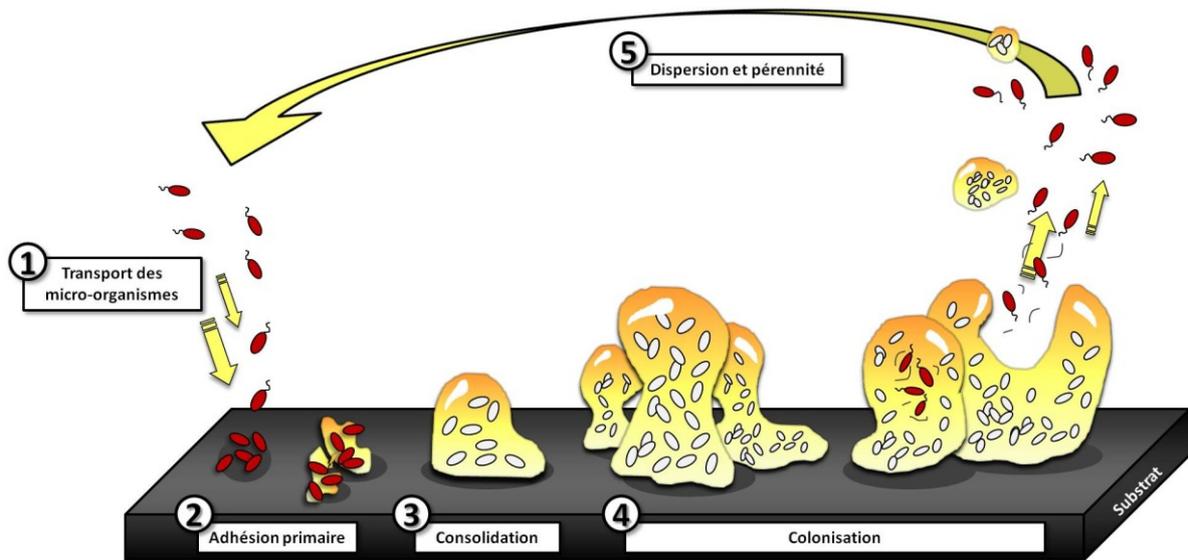


Figure I.2-2 : Etapes de la formation d'un biofilm.

I.2.2.1 Le transport

Toute adsorption de micro-organismes sur une surface réceptrice suppose le rapprochement des deux acteurs. Le transport de micro-organismes peut être correctement décrit en termes de diffusion pour des particules de petites tailles (0,01 à 0,1 μm) (Macguire & Kridhasirna 1992). A l'inverse, le transport de micro-organismes, considérés comme des particules de grandes tailles (0,5 à 10 μm) dépend des conditions hydrodynamiques du fluide environnant.

Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en conditions statiques ou en écoulement laminaire), les particules peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (Marshall 1986 ; Characklis *et al.* 1990) comme :

- le phénomène de sédimentation, dû aux forces de gravité, qui devient prépondérant en cas d'agrégation ou de floculation des particules (Dickson & Daniels 1991 ; Banks & Bryers 1992),
- le mouvement brownien, qui peut à lui seul provoquer la désorption spontanée de particules adsorbées sur une surface si les forces d'adhésion particules/support sont trop faibles (Équation I.2-1). Chaque molécule ou particule immergée dans un milieu liquide présente une énergie de Brown (van Oss 1996). On considère cette force comme négligeable dans le cas de particules de dimensions supérieures à 1 µm (micro-organismes par exemple),

$$\text{Équation I.2-1} \quad E = \frac{3}{2} K_B T$$

où T est la température en Kelvin et K_B est la constante de Boltzmann.

- le phénomène de chimiotaxie. Ce mécanisme n'est possible que si les micro-organismes sont doués d'une motilité autonome. Ces derniers se déplacent vers des substances nutritives (acides aminés, sources carbonées) grâce aux signaux détectés par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques,
- certaines forces décrites par la dynamique des fluides. Lorsque les forces de cisaillement sont importantes, le transport des micro-organismes vers la surface est régi par des phénomènes qui se produisent dans la masse liquide ou dans la couche laminaire.

I.2.2.2 L'adhésion initiale

Cette étape peut être considérée comme l'étape clé de la formation des biofilms puisqu'elle traduit l'affinité des micro-organismes pour un substrat. Plus cette affinité est grande, plus l'adhésion considérée est favorable.

A partir d'une distance de 50 nm, les micro-organismes peuvent interagir avec la surface réceptrice par l'intermédiaire d'une succession d'interactions de longue puis de courte distance de nature physico-chimique : on parle alors d'adhésion microbienne (Bussher & Weerkamp 1987 ; van Loosdrecht *et al.* 1990). Cette adhésion est un processus complexe et encore mal connu qui est affecté par différentes propriétés physico-chimiques, à la fois de la surface des cellules microbiennes mais aussi du matériau colonisé. Ces propriétés conditionnent la propension des différentes surfaces à adhérer entre elles. Cette étape d'adhésion initiale peut être divisée en deux étapes principales (Figure I.2-3) : (i) une phase qui correspond à une adsorption réversible des cellules et (ii) une phase dite d'adhésion correspondant à une fixation irréversible des micro-organismes.

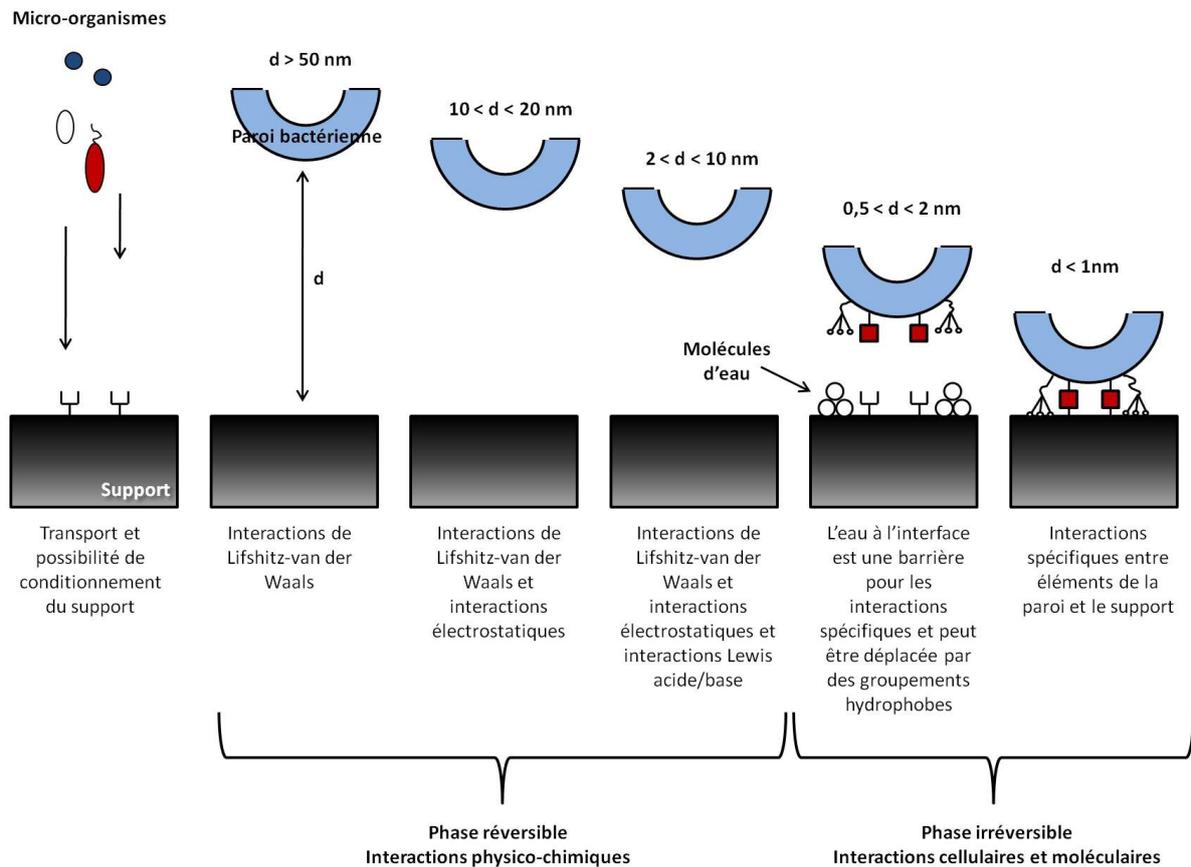


Figure I.2-3 : Schéma descriptif des interactions impliquées dans l'étape d'adhésion initiale.

I.2.2.2.1 L'adhérence ou phase réversible de l'adhésion primaire

Une fraction des micro-organismes planctoniques transportés dans un solvant (eau) se dépose à la surface du matériau à coloniser. Cette étape non spécifique fait uniquement intervenir des processus physico-chimiques et reste dépendante de la nature du support (conditionnement, topographie). Les micro-organismes sont tout d'abord attirés dans un minimum énergétique secondaire par les forces de Lifshitz-van der Waals. Une fois la distance entre le micro-organisme et le substrat inférieure à 20 nm, des forces de répulsions électrostatiques rentrent en considération étant donné que les micro-organismes (bactéries notamment) et les surfaces présentent dans la majorité des cas, une charge globale de surface négative. Cette phase est en général de courte durée (Gauthier & Isoard 1989). A partir d'une distance inférieure à 5 nm entre le micro-organisme et le substrat, des interactions acide/base de Lewis rentrent également en jeu.

I.2.2.2.2 L'adhésion ou phase irréversible de l'adhésion primaire

Dans un deuxième temps, des interactions de courte distance entrent en jeu lorsque la distance bactérie-substrat est de l'ordre du nanomètre. Celles-ci sont spécifiques, irréversibles et correspondent :

- aux interactions acide/base (au sens de Lewis), qui permettent la formation de liaisons hydrogène. Ce sont des interactions fortes, de courte distance, possibles lorsqu'un atome d'hydrogène est en contact avec un atome électronégatif,
- aux interactions hydrophobes, qui entrent en jeu lors d'une adhésion en milieux aqueux,
- aux interactions électrostatiques, caractérisées par la formation de ponts entre une charge négative du micro-organisme et une charge négative du substrat, par l'intermédiaire de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}),
- aux interactions de Lifshitz-van der Waals toujours présentes.

Ces interactions seront décrites plus précisément par la suite (*cf. I.2.4, p. 74*).

De manière générale, les micro-organismes adhèrent de manière réversible aux supports dont ils peuvent facilement se détacher sous l'action de contraintes hydrodynamiques imposées au/par le milieu. On considère que cette étape est plus lente que la précédente, l'irréversibilité de l'adhésion faisant appel au métabolisme microbien, notamment via la sécrétion de Substances Polymériques Extracellulaires, dont les bactéries s'entourent par exemple (glycocalyx) afin de consolider le phénomène d'adhésion.

I.2.2.3 La consolidation

Pour se maintenir sur les surfaces durant de longues périodes, les micro-organismes doivent former des liaisons de haute affinité en produisant des SPE afin de consolider leur adhésion. Ces SPE ont pour rôle de protéger les micro-organismes du biofilm contre la dessiccation, les antibiotiques et permettent même de moduler les éléments nutritifs exogènes disponibles (Bertrand 2004). Plusieurs études ont mis en évidence que l'attachement aux surfaces commence par un changement phénotypique des cellules microbiennes qui favorise l'adhésion et entraîne l'initiation de la formation de micro-colonies (Caldwell & Lawrence 1986) et par conséquent la formation du biofilm.

I.2.2.4 La colonisation

Dans des conditions favorables, lorsque les micro-organismes sont fixés de manière irréversible au support, les cellules peuvent se multiplier, proliférer et interagir via les mêmes interactions précédemment décrites (Bellon-Fontaine *et al.* 2008). Il y a alors accroissement de la biomasse et production de métabolites sécrétés par les micro-organismes. Cette phase de croissance est caractérisée par trois étapes, à savoir (i) une phase dynamique de croissance, (ii) une phase linéaire de croissance, qui traduit une évolution à taux constant et maximale du biofilm et (iii) une phase de ralentissement, qui correspond à un début d'équilibre du biofilm entre le taux de multiplication et d'accumulation des micro-organismes et le taux de détachement de matière. Enfin, en plus de la multiplication des cellules constitutives du biofilm, la croissance de ce dernier peut également être attribuée à des cellules planctoniques venant s'adhérer à sa surface (Boutaleb 2007).

I.2.3 Modèles théoriques prédictifs de l'adhésion

I.2.3.1 L'énergie libre de surface

Tout corps est constitué de molécules, atomes ou ions, liés entre eux par des forces plus ou moins intenses et assurant la cohésion du corps. A la surface, il existe un certain nombre de liaisons non saturées. Ainsi, les atomes superficiels subissent un champ de force différent de celui des atomes présents dans l'intérieur cristallin. De part la situation particulière de ces atomes de surface, il existe un champ de force superficiel attractif qui tend à rétablir la symétrie de celui existant dans la matière en satisfaisant leurs liaisons chimiques. La résultante des forces extérieures subies par les atomes superficiels engendre donc une énergie de surface dans le cas d'un solide. On parle de tension superficielle dans le cas d'un liquide (Kaoru 1998).

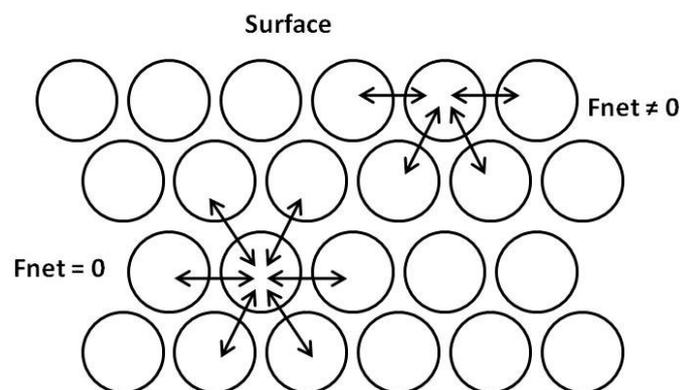


Figure I.2-4 : Représentation des forces d'interactions en surface et en profondeur, d'après Comte (2004).

L'Energie Libre Superficielle d'un solide (ELS) est une grandeur physique qui englobe les interactions de Lifshitz-van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions polaires. Différentes approches ont été développées pour étudier l'adhésion de micro-organismes sur des surfaces solides et déterminer cette ELS. Toutefois, ces approches ne prennent pas toujours en compte les mêmes types interactions et sont donc complémentaires.

L'adhésion microbienne a été ainsi décrite par la théorie du mouillage donnée par la thermodynamique des surfaces (Bos *et al.* 1999) ainsi que par la théorie de la stabilité de l'état colloïdal ou DLVO (Derjaguin, Landua, Vervey et Overbeek).

I.2.3.2 L'approche thermodynamique

Lorsque la bactérie se trouve au minimum énergétique primaire, un film d'eau est maintenu entre cette dernière et la surface du solide. D'après l'approche thermodynamique, l'énergie d'adhésion (ΔG_{adh}) exercée par un micro-organisme pour supprimer cette couche d'eau, et donc, passer d'un système à deux interfaces (micro-organisme / liquide (γ_{ML}), liquide / substrat (γ_{LS})) à un système à une interface (micro-organisme / substrat (γ_{MS})), correspond à la variation d'énergie libre du système. L'approche thermodynamique utilise l'équation développée par Dupré (1869) :

$$\text{Équation I.2-2} \quad \Delta G_{adh} = \gamma_{MS} - \gamma_{ML} - \gamma_{LS}$$

où γ_{MS} , γ_{ML} et γ_{LS} représente respectivement les énergies d'interface entre le micro-organisme et le support, le micro-organisme et le milieu liquide, le support et le milieu liquide¹.

L'adhésion est favorisée si l'énergie libre par unité de surface (ΔG_{adh}) est négative, c'est-à-dire si γ_{MS} est moins élevée que la somme de γ_{ML} et γ_{LS} . En effet, dans ce cas, l'ELS à laquelle est « confrontée » le micro-organisme quand il se trouve dans un système à une interface est inférieure à l'ELS présente dans un système à deux interfaces.

I.2.3.3 L'approche de l'adhésion par la théorie DLVO

I.2.3.3.1 La théorie DLVO classique

D'après la théorie DLVO classique (Derjaguin & Landau 1941 ; Verwey & Overbeek 1948), une particule qui s'approche à une certaine distance d'une surface donnée va interagir avec cette surface par des forces de type Lifshitz-van der Waals ou électrostatiques répulsives et/ou attractives.

¹ Cette formulation équivaut à celle décrite par la suite où (1), (3) et (2) représenteront respectivement le micro-organisme, la surface et le milieu liquide.

Cette théorie fournit une bonne description du comportement des particules colloïdales mais ne prend pas en compte les interactions intermoléculaires à courte distance. Cette modélisation peut toutefois être appliquée pour prévoir l'adhésion des micro-organismes aux surfaces, sachant que ces derniers sont loin d'être des particules idéales. Ils n'ont ni géométrie simple, ni composition moléculaire uniforme, et sont donc difficilement « modélisables ». On peut cependant les assimiler à des colloïdes lorsque leur taille est voisine de 1µm.

Selon la théorie DLVO, l'adhésion microbienne est le résultat d'un équilibre s'établissant entre les forces de Lifshitz-van der Waals et les forces électrostatiques. L'énergie libre d'interaction nette totale entre le micro-organisme et le support, appelée aussi énergie de Gibbs (G_T), est donc la résultante de l'énergie d'attraction due aux forces de Lifshitz-van der Waals G_V et de l'énergie électrostatiques G_E provenant de la surface des cellules et du substrat :

$$\text{Équation I.2-3} \quad G_T = G_V + G_E$$

On note que les interactions électrostatiques sont généralement répulsives de part la charge négative du support et des surfaces des cellules.

G_T est fonction notamment de la force ionique du milieu. En 1988, Satou *et al.* (1988) concluent que la diminution de la force ionique du milieu induit une augmentation des charges électrostatiques. Il y a alors apparition de répulsions électrostatiques ce qui induit une diminution de l'adhésion bactérienne ($G_T > 0$).

Par contre, à force ionique élevée, les interactions électrostatiques sont masquées par les nombreuses charges du milieu et l'interaction nette totale est attractive, de part les forces de Lifshitz-van der Waals, ce qui crée des conditions favorables à l'adhésion bactérienne ($G_T < 0$) (Allion 2004 ; Boutaleb 2007).

I.2.3.3.2 La théorie DLVO étendue ou approche GVOC

Van Oss *et al.* (1986) ont étendu l'approche DLVO classique en incluant les interactions acide/base de Lewis. Cette théorie porte le nom de GVOC (Good-van Oss-Chaudhury). Les interactions acide/base de Lewis prennent en compte les forces d'attraction hydrophobes et les forces de répulsion hydrophiles.

L'énergie totale d'adhésion est alors la résultante des interactions de Lifshitz-van der Waals, des interactions électrostatiques et des interactions acide-base de Lewis dont l'influence est plus forte que les deux autres. Cependant, ces dernières nécessitent une proximité importante entre la surface du micro-organisme et la surface à coloniser, c'est-à-dire moins de 5 nm (Figure I.2-3). Pour l'étude de l'adhésion de micro-organismes en milieu aqueux, cette théorie qui tient compte des interactions acide-base de Lewis, semble plus appropriée que la théorie DLVO classique (Wu *et al.* 1999).

I.2.3.3.3 Théorie GVOC améliorée

Della Volpe & Siboni (2000) ont apporté une modification à la théorie GVOC, en considérant que la théorie GVOC accentuait significativement le caractère basique des polymères non hydrophiles notamment, au détriment du caractère acide. Afin de prendre en compte cette observation, les auteurs ont proposé de considérer le caractère accepteur d'électrons de l'eau. L'accentuation du caractère acide de l'eau par ce facteur correctif¹ permet ainsi d'atténuer le caractère basique des substrats étudiés par la méthode de mesures d'angles de contact.

I.2.4 Phénomènes d'adsorption physico-chimiques à l'origine de l'adhésion primaire

L'adsorption est un phénomène qui décrit les interactions existant entre la surface d'un solide et les molécules en phase gazeuse ou liquide au voisinage d'une interface (Rouquerol *et al.* 1999). Le solide sur lequel l'adsorption a lieu est appelé adsorbant et le fluide qui va s'adsorber est l'adsorbable. Les interactions de surface entre l'adsorbant et l'adsorbable dépendent fortement de la nature chimique des constituants mis en jeu. La complexité du phénomène d'adsorption des micro-organismes est largement liée à l'hétérogénéité de la structure du micro-organisme et à celle des surfaces adsorbantes. Cette hétérogénéité peut engendrer des interactions de natures diverses, dues à la présence de domaines hydrophobes, polaires ou chargés à la surface du matériau et/ou du micro-organisme (Hamadouche 2003).

¹ Les auteurs ont en fait choisi des valeurs de référence de la tension interfaciale de l'eau inférieures à celles utilisées par la méthode GVOC.

Une fois les micro-organismes arrivés à proximité des surfaces par différents mécanismes de transport, ces derniers adhèrent par l'intermédiaire de différentes interactions physico-chimiques (van der Mei *et al.* 1991) complémentaires et/ou successives qui incluent : les forces de Lifshitz-van der Waals, les forces électrostatiques et les interactions acide/base de Lewis (Figure I.2-3). Les interactions entre une bactérie et une surface solide immergée dans un liquide vont ainsi dépendre des propriétés physico-chimiques de surface de chacun des corps en présence.

I.2.4.1 Interactions de Lifshitz-van der Waals

Les forces de Lifshitz-van der Waals peuvent se décrire brièvement comme une interaction attractive entre deux atomes neutres (Boutaleb 2007). Elles sont dues à l'interaction des électrons d'une molécule avec les noyaux des molécules voisines.

En réalité, ces forces correspondent à des phénomènes complexes, uniquement et totalement compréhensibles dans le cadre de la physique quantique. Ces forces sont universelles et interviennent quels que soient les corps considérés. N'étant pas assez fortes pour donner lieu à des structures géométriques définies, elles diffèrent des liaisons chimiques. Elles ne donnent ainsi lieu qu'à des édifices de dimensions variables, qui se font et se défont en permanence. Comme il s'agit de liaisons faibles, ces forces diminuent avec la distance et sont efficaces seulement si plusieurs atomes d'une molécule interagissent avec plusieurs atomes d'une autre molécule (Hamadouche 2003). Il a été démontré que les forces de Lifshitz-van der Waals comprennent trois types de forces : les forces de Keesom, les forces de Debye et les forces de London (Figure I.2-5). Au niveau macroscopique, ces trois forces interfaciales sont regroupées sous le terme d'interactions de Lifshitz-van der Waals (Lifshitz 1955). Ces forces sont majoritaires au cours de la phase d'adhésion réversible à des distances supérieures à 50 nm et décroissent à une distance inférieure à 10 nm (Figure I.2-3).

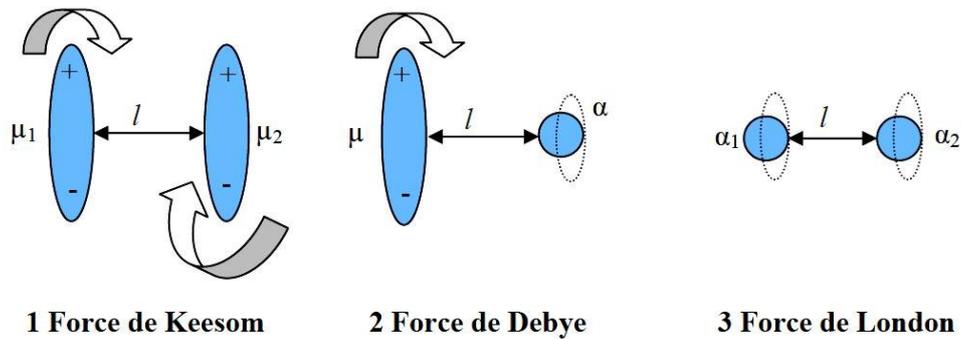


Figure I.2-5 : Les trois types d'interactions de Lifshitz-van der Waals, d'après Boutaleb (2007).

I.2.4.1.1 Forces de Keesom (forces d'orientation)

Ces forces, responsables de l'orientation des molécules, ont été décrites par Willem Hendrik Keesom en 1912. Elles caractérisent les interactions intermoléculaires entre deux dipôles permanents. L'énergie U produite par les forces de Keesom entre deux molécules 1 et 2 séparées par la distance l répond à la relation suivante (Gerschel 1995) :

$$\text{Équation I.2-4} \quad U_{Keesom} = -\frac{2\mu_1^2\mu_2^2}{3(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2K_B T l^6}$$

où μ correspond au moment dipolaire, K_B correspond à la constante de Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T correspond à la température absolue, ϵ_0 correspond à la permittivité du vide et ϵ correspond à la permittivité du milieu dans lequel les molécules évoluent.

I.2.4.1.2 Forces de Debye (forces d'induction)

Décrites par Debye en 1920, ces forces impliquent des interactions entre un dipôle permanent et un dipôle induit. Un dipôle induit résulte de l'interaction entre un atome ou une molécule initialement non polarisée avec un champ électrique externe provenant d'un rayonnement électromagnétique ou d'une molécule dipolaire. En effet, tout atome ou molécule est plus ou moins polarisable en fonction de la capacité qu'ont les nuages électroniques à se déformer. L'énergie produite par les forces de Debye entre deux molécules séparées par une distance l est décrit par l'Équation I.2-5.

$$\text{Équation I.2-5} \quad U_{Debye} = -\frac{4\alpha\mu^2}{(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2 l^6}$$

où μ correspond au moment dipolaire, et α correspond à la polarisabilité.

I.2.4.1.3 Forces de London

Ces forces, décrites par London en 1937, sont des forces intermoléculaires faibles qui proviennent des forces attractives entre deux molécules non polaires. Elles existent du fait que la densité électronique à travers les molécules n'est pas équitablement répartie. N'importe quelle molécule présente donc, à un moment t , un moment dipolaire instantané capable de créer un champ électrique et faire apparaître des dipôles induits en phase dans les molécules voisines. L'Équation I.2-6 décrit l'énergie produite par les forces de London pour deux molécules 1 et 2 séparées par une distance l :

$$\text{Équation I.2-6} \quad U_{\text{London}} = -\frac{3\alpha_1\alpha_2h\nu}{4(4\pi\epsilon\epsilon_0)^2l^6}$$

où h correspond à la constante de Planck, α correspond à la polarisabilité et ν correspond à la fréquence de dispersion.

I.2.4.1.4 Effet cumulatif de ces interactions

L'énergie d'interaction liée aux forces de Lifshitz-van der Waals entre deux corps 1 et 2, plongés dans le vide, est définie par l'équation de Dupré (1869) :

$$\text{Équation I.2-7} \quad \Delta G_{12}^{LW} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_1^{LW} - \gamma_2^{LW}$$

La tension interfaciale liée aux forces de van der Waals entre ces deux corps, est définie quant à elle par la relation de Good & Girifalco (1960) :

$$\text{Équation I.2-8} \quad \gamma_{12}^{LW} = (\sqrt{\gamma_1^{LW}} - \sqrt{\gamma_2^{LW}})^2$$

La combinaison des Équation I.2-7 et Équation I.2-8 permet de déterminer l'énergie d'interaction due aux forces de Lifshitz-van der Waals :

$$\text{Équation I.2-9} \quad \Delta G_{12}^{LW} = -2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}}$$

Ainsi, quelles que soient les valeurs des composantes Lifshitz-van der Waals de la tension de surface des corps 1 et 2 (γ_1^{LW} et γ_2^{LW}), ΔG_{12}^{LW} est négative, indiquant une attraction entre les deux corps.

Dans le phénomène d'adhésion de cellules microbiennes, trois corps sont généralement en présence. Il est alors nécessaire de déterminer l'énergie d'interaction entre le micro-organisme (1) et le support (2) immergés dans un liquide (3) (Allion 2004). L'équation de Dupré peut alors s'écrire selon l'Équation I.2-10¹ :

$$\text{Équation I.2-10} \quad \Delta G_{123}^{LW} = \gamma_{12}^{LW} - \gamma_{13}^{LW} - \gamma_{23}^{LW}$$

En développant les valeurs de tensions interfaciales à l'aide de l'Équation I.2-8, on obtient :

$$\text{Équation I.2-11} \quad \Delta G_{123}^{LW} = 2(\sqrt{\gamma_3^{LW}} - \sqrt{\gamma_1^{LW}})(\sqrt{\gamma_2^{LW}} - \sqrt{\gamma_3^{LW}})$$

On considère ainsi que l'interaction sera répulsive (ΔG_{123}^{LW}) pour $\gamma_1^{LW} < \gamma_3^{LW} < \gamma_2^{LW}$ ou $\gamma_1^{LW} > \gamma_3^{LW} > \gamma_2^{LW}$. A l'inverse, tous les autres cas seront représentatifs d'interactions attractives. Ainsi, sous certaines conditions, des interactions répulsives liées aux forces de Lifshitz-van der Waals peuvent avoir lieu entre deux corps immergés dans un liquide.

I.2.4.2 Interactions électrostatiques

Immergée dans un fluide une bactérie acquiert par adsorption ionique, ou ionisation des groupements chargés de sa paroi externe, une charge de surface (James 1991) qui dépend du pH du milieu. Une accumulation de contre-ions va alors avoir lieu dans une zone restreinte entourant la particule, à l'origine de la formation d'une double couche électrique (Hiemenz 1997).

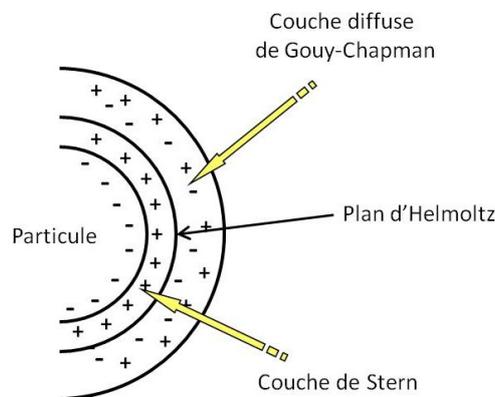


Figure I.2-6 : Structure de la double couche ionique, d'après Hiemenz (1997).

¹ Selon l'approche thermodynamique.

La couche de Stern est constituée d'ions fortement adsorbés sur la surface de la particule et mesure environ l'épaisseur d'un ion. Dans cette région, le potentiel Ψ est inversement proportionnel à la distance de séparation avec la surface. A l'inverse, la couche diffuse de Gouy-Chapman s'étend jusqu'à la phase liquide, zone dans laquelle l'excès de contre-ions diminue progressivement en s'éloignant de la surface chargée jusqu'à atteindre l'équilibre ionique de la phase aqueuse. On considère dans cette zone que le potentiel Ψ décroît exponentiellement avec la distance.

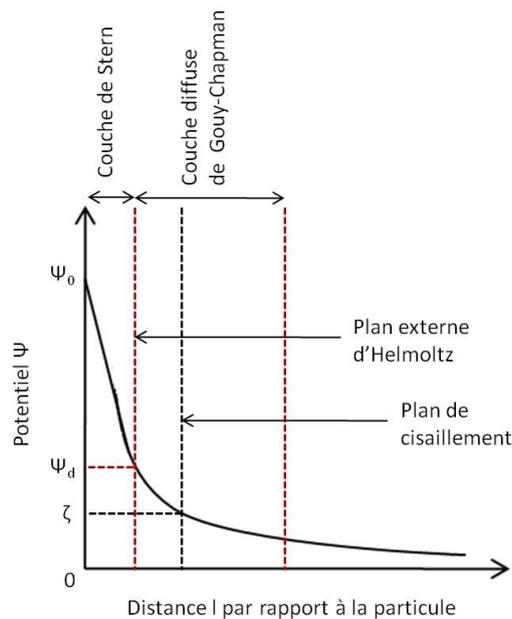


Figure 1.2-7 : Représentation schématique de la variation de potentiel en fonction de la distance de la particule chargée, d'après James (1991).

Les interactions électrostatiques intervenant entre la surface d'un micro-organisme et la surface réceptrice sont dues au recouvrement de la double couche ionique associé aux groupements chargés présents à la surface des deux corps (Rutter & Vincent 1980). On caractérise cette interaction d'attractive ou de répulsive en fonction de la charge des surfaces mises en jeu. La relation de Visser (1976) permet de calculer l'énergie libre ΔG^{EL} due aux interactions électrostatiques entre une sphère (particule bactérienne) et une surface plane :

$$\text{Équation 1.2-12} \quad \Delta G^{EL} = R\Psi_0^2\varepsilon \ln[1 + \exp(-\kappa l)]$$

où R est le rayon de la sphère, l est la distance mesurée à partir du bord extérieur de la particule, ε est la constante diélectrique du milieu liquide et $1/\kappa$ est la longueur de Debye.

Le potentiel de surface de la particule Ψ_0 n'est pas directement mesurable mais peut être déterminé par la mesure¹ du potentiel zêta ξ , correspondant au potentiel électrocinétique mesuré dans la couche diffuse et au voisinage de la couche de Stern (Figure I.2-7) :

$$\text{Équation I.2-13} \quad \Psi_0 = \zeta \left(1 + \frac{z}{a}\right) \exp(\kappa z)$$

Considérant l'équation :

$$\text{Équation I.2-14} \quad \frac{1}{\kappa} = \sqrt{\frac{\epsilon k T}{4\pi e^2 \sum_i v_i^2 n_i}}$$

où $1/\kappa$ correspond à la longueur de Debye (épaisseur de la couche diffuse), z correspond à la distance entre la surface de la particule et la surface de friction, a correspond au rayon de la particule, ϵ correspond à la constante diélectrique du milieu liquide, v_i correspond à la valence de chaque espèce ionique, n_i correspond au nombre d'ions de chaque espèce par cm^3 de liquide, e correspond à la charge de l'électron, k correspond à la constante de Boltzmann et T correspond à la température absolue (K) .

On considère ΔG^{EL} comme négligeable pour des liquides de force ionique élevée². En outre, cette énergie d'interaction diminue exponentiellement avec la distance de séparation l entre les corps³.

I.2.4.3 Interactions polaires

Les interactions polaires sont des interactions produites en milieu aqueux qui décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance. Elles concernent principalement l'interaction entre donneur et accepteur d'électrons, ou entre donneur et accepteur d'hydrogène selon Bronsted (van Oss 1996 ; Hamadi 2005).

¹ Par des méthodes électrophorétiques.

² ΔG^{EL} est fonction de la grandeur $1/k$. ΔG^{EL} diminue progressivement si la force ionique du liquide de suspension augmente.

³ Si l'on considère l'Équation I.2-12.

I.2.4.3.1 Liaisons hydrogène

A proximité des surfaces solides, les molécules d'eau s'organisent en une structure quasi cristalline. Il en résulte la création de liaisons hydrogène soit entre les atomes électronégatifs des surfaces (O, Cl, F, N) et les atomes d'hydrogène de la molécule d'eau, soit entre les atomes d'hydrogène des surfaces et l'atome d'oxygène de la molécule d'eau. Un composé donné (molécule, macromolécule, particule, surface...) peut ainsi être caractérisé comme :

- hydrophile, ou capable d'intervenir dans la formation de liaisons hydrogène,
- hydrophobe, c'est-à-dire incapable d'intervenir dans la formation de liaisons hydrogène.

Il existe différents degrés dans ce caractère, qui se traduisent par l'existence d'interactions hydrophiles et hydrophobes plus ou moins marquées.

I.2.4.3.2 Répulsions hydrophiles

Dans le cas de surfaces polaires ou chargées, les groupements fonctionnels de la surface deviennent hydratés : ils s'associent avec des molécules d'eau par des liaisons hydrogène. L'interaction entre deux surfaces hydratées est une interaction répulsive. En effet, l'affinité de chacune de ces surfaces pour l'eau se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau. Or, pour parvenir à un contact rapproché des deux surfaces, il est nécessaire que celles-ci libèrent les molécules d'eau associées en fournissant de l'énergie. Il en résulte une énergie de répulsion hydrophile, ΔG^{AB} , positive. Selon la théorie développée par van Oss (1996), dans le cas de particules hydrophiles, il est possible de distinguer celles qui ont des propriétés de surface acides (accepteurs d'électrons) de celles qui ont des propriétés de surface basiques (donneurs d'électrons) au sens de Lewis. Notons qu'une répulsion hydrophile aura lieu entre deux corps de « nature » identique au sens de Lewis.

I.2.4.3.3 Attractions hydrophobes

Dans le cas où une surface solide ne porte pas de groupements fonctionnels ioniques ou polaires, ni de sites adéquats pour la formation de liaisons hydrogène, cette surface a peu d'affinité pour l'eau, elle est dite hydrophobe. Autour de ces surfaces, l'eau va s'organiser d'une façon défavorable d'un point de vue entropique (plus ordonnée que dans la masse de la phase aqueuse). Elle va donc tendre à se dissocier de ce type de surface, ce qui se traduit par une énergie d'attraction hydrophobe. L'énergie d'attraction hydrophobe qui en résulte, ΔG^{AB} , est négative.

I.2.4.3.4 Effet combiné des interactions acide/base de Lewis

L'énergie d'interaction liée aux forces acide/base de Lewis ΔG_{12}^{AB} entre deux corps 1 et 2 plongés dans le vide est décrite par la relation de Dupré (1869) :

$$\text{Équation I.2-15} \quad \Delta G_{12}^{AB} = \gamma_{12}^{AB} - \gamma_1^{AB} - \gamma_2^{AB}$$

On exprime par ailleurs la tension de surface liée aux interactions Lewis acide/base d'un corps x par la relation (van Oss *et al.* 1988) :

$$\text{Équation I.2-16} \quad \gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$$

où γ^+ correspond au paramètre accepteur d'électrons et γ^- correspond au paramètre donneur d'électrons de la tension superficielle des corps 1 et 2.

L'Équation I.2-17 définit quant à elle la tension superficielle liée aux interactions Lewis acide/base entre deux corps 1 et 2 :

$$\text{Équation I.2-17} \quad \gamma^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_1^+} - \sqrt{\gamma_2^+})(\sqrt{\gamma_1^-} - \sqrt{\gamma_2^-})$$

La combinaison des Équation I.2-15, Équation I.2-16 et Équation I.2-17 permet d'obtenir la relation suivante :

$$\text{Équation I.2-18} \quad \Delta G_{12}^{AB} = -2(\sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} + \sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+})$$

ΔG_{12}^{AB} est toujours négatif, traduisant ainsi une attraction entre les deux corps plongés dans le vide. De la même manière que précédemment, l'expression de l'énergie d'interaction dans le cas de l'adhésion microbienne entre deux corps (1) et (2) dans un liquide (3) peut être définie par la relation suivante :

$$\text{Équation I.2-19} \quad \Delta G_{123}^{AB} = \gamma_{12}^{AB} - \gamma_{13}^{AB} - \gamma_{23}^{AB}$$

L'introduction des valeurs développées des tensions de surface liée aux forces acide/base de Lewis permet d'établir l'Équation I.2-20 :

$$\text{Équation I.2-20}$$

$$\Delta G_{123}^{AB} = 2(\sqrt{\gamma_3^+}(\sqrt{\gamma_1^-} + \sqrt{\gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_3^-}) + \sqrt{\gamma_3^-}(\sqrt{\gamma_1^+} + \sqrt{\gamma_2^+} - \sqrt{\gamma_3^+}) - \sqrt{\gamma_1^+ \gamma_2^-} - \sqrt{\gamma_1^- \gamma_2^+})$$

Allion (2004) souligne d'ailleurs qu'en fonction des valeurs de γ^+ et γ^- des trois corps en présence, ΔG_{123}^{AB} peut prendre des valeurs négatives (attraction) ou positives (répulsion).

I.2.4.4 Interactions liées au mouvement Brownien

Chaque molécule ou particule, immergée dans un milieu liquide, est dotée d'une énergie libre brownienne (BR) définie par la relation de van Oss (1996) :

$$\text{Équation I.2-21} \quad \Delta G^{BR} = \frac{3}{2} kT$$

où k correspond à la constante de Boltzmann et T correspond à la température absolue (K).

A condition que l'énergie d'attraction entre les molécules ou particules immergées dans le liquide soit inférieure à $\frac{3}{2} kT$, l'énergie libre brownienne maintient les molécules en solution ou en suspension. Cette observation est d'ailleurs primordiale pour comprendre la phase de transport et l'initiation de la phase réversible d'adhésion intervenant au cours de la formation d'un biofilm (Figure I.2-2, Figure I.2-3).

Cette contribution joue le plus grand rôle pour des particules présentant de faibles surfaces de contact. Dans ce cas, ces dernières seront moins susceptibles d'interagir avec d'autres molécules et/ou surfaces par le biais d'interactions de Lifshitz-van der Waals, d'interactions acide/base de Lewis ou d'interactions électrostatiques.

I.2.5 Méthodes classiques d'analyse des propriétés de surface de micro-organismes

La caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes est de première importance. Le développement de techniques analytiques, basées sur les nombreuses théories et descriptions fondamentales développées précédemment, permet d'étudier et comprendre les phénomènes d'adhésion primaire entre un micro-organisme et une surface ou entre micro-organismes. En outre, la détermination de paramètres énergétiques propres et uniques à la surface de chaque bactérie permet de classer l'intensité de leurs propriétés de surface. Cette partie s'appliquera à décrire brièvement les techniques majeures utilisées à l'heure actuelle et plus particulièrement celles mises en œuvre au cours de ces travaux.

I.2.5.1 Zétamétrie

De manière pratique, la zétamétrie permet d'accéder à la charge globale de surface des micro-organismes. Cette charge, due aux ions qui les entourent dans le liquide où ils sont plongés, est mesurée grâce à la détermination de leur mobilité à différents pH sous l'influence d'un champ électrique¹. Le sens de déplacement des micro-organismes permet de déterminer le signe de leur charge globale de surface alors que leur vitesse de déplacement (V) sous l'action d'un champ électrique E peut être reliée à la mobilité électrophorétique (ME) :

$$\text{Équation I.2-22} \quad ME = \frac{V}{E}$$

où V correspond à la vitesse de déplacement des micro-organismes (m/s) et où E, le champ électrique est exprimé en V/m.

Certains travaux ont mis en évidence que des familles de bactéries présentaient des points de charge nulle identiques (Pelletier *et al.* 1997). Rijnaarts *et al.* (1995) ont corrélé cette observation avec la composition de surface des micro-organismes.

¹ Les micro-organismes étudiés ne doivent pas être doués d'une motilité propre.

Ainsi, (i) un point isoélectrique inférieur à 2,8 (pH) traduit la présence de polysaccharides de surface riches en groupements phosphates et/ou carboxylates, (ii) un point isoélectrique égal à 3 (pH) indique la présence de composés de surfaces amphiphiles et (iii) un point isoélectrique supérieur à 3,2 indique la présence de chaînes carbonées non chargées.

I.2.5.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) est une spectroscopie d'absorption qui permet l'identification des groupements moléculaires d'un échantillon. Les liaisons chimiques absorbent le rayonnement infrarouge (IR) à des longueurs d'ondes spécifiques dépendant de leur nature et de leur conformation. Les informations données par le spectre permettent l'identification et le dosage des différents constituants. Le rayonnement infrarouge est une radiation de nature électromagnétique, correspondant à la partie du spectre comprise entre 12800 cm^{-1} et 10 cm^{-1} (Rouessac & Rouessac 1994). Cette fenêtre spectrale de l'IR se décompose en trois domaines : le proche, le moyen et le lointain IR. La plage spectrale, qui s'étend de 4000 cm^{-1} à 400 cm^{-1} ($2,5\text{ }\mu\text{m}$ à $25\text{ }\mu\text{m}$), est la plus adaptée à l'analyse d'échantillons biologiques organiques. En effet, ce domaine, correspondant aux transitions moléculaires de type vibration et rotation, contient la quasi-totalité des signatures spectrales des molécules du vivant : polysaccharides, lipides, protéines, acides nucléiques (Keirsse 2003 ; Boutaleb 2007).

Lorsqu'une molécule est irradiée par un rayonnement IR, elle peut absorber partiellement et sélectivement ce rayonnement. Les liaisons chimiques qui la composent doivent être considérées comme des oscillateurs anharmoniques, une liaison n'étant pas parfaitement élastique (Figure I.2-8). Si une liaison oscille à la même fréquence que la composante électrique de l'onde lumineuse IR, celle-ci pourra alors transmettre son énergie de liaison. Un rayonnement de fréquence donnée pourra être absorbé ce qui conduira à l'état excité, caractérisé par une amplitude de vibration plus élevée. De ce fait, l'énergie du rayonnement IR se retrouve diminuée après l'interaction, conduisant à l'apparition d'une bande d'absorption à cette fréquence. L'énergie absorbée (ν_0) est donc caractéristique de chacune des liaisons chimiques de la molécule ou de l'échantillon analysé (Rouessac & Rouessac 1994 ; Keirsse 2003).

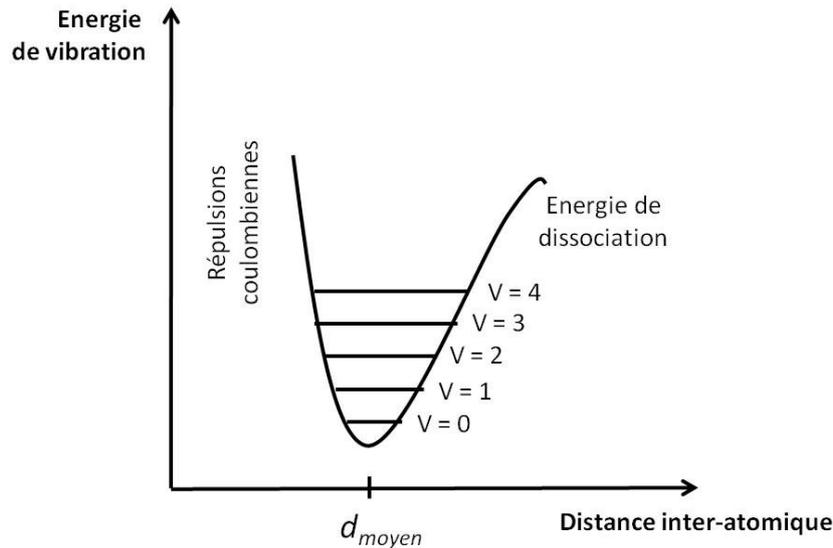


Figure I.2-8 : Potentiel anharmonique et niveaux d'énergie vibrationnelle.

Le spectre IR est ainsi constitué de nombreuses bandes d'absorption. Il est représenté pour chaque longueur d'onde λ par l'équation :

$$\text{Équation I.2-23} \quad T = \frac{I_{\text{éch}}}{I_0}$$

où T correspond à la transmittance, $I_{\text{éch}}$ correspond à l'intensité transmise en présence de l'échantillon et I_0 correspond à l'intensité transmise sans échantillon.

Du fait de l'additivité de l'absorbance (en mode d'absorption), on considère que :

$$\text{Équation I.2-24} \quad A = \log\left(\frac{1}{T}\right)$$

où A correspond à l'absorbance et T correspond à la transmittance.

De manière générale, exprimer A en fonction du nombre d'onde $\bar{\nu}$ est préféré à la longueur d'onde λ car $\bar{\nu}$ est directement proportionnel à une énergie :

$$\text{Équation I.2-25} \quad E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

où h correspond à la constante de Planck ($6,62 \cdot 10^{-34}$ J.s), ν correspond à la fréquence (Hz), $\bar{\nu}$ correspond au nombre d'ondes (cm^{-1}) et c correspond à la célérité de la lumière ($3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹).

Les biomolécules, les molécules organiques ou les échantillons biologiques au sens général présentent une signature unique et caractéristique en IRTF, qui se traduit par des spectres complexes de part la présence de multiples bandes d'absorption qui parfois se superposent.

L'étude des spectres infrarouge permet d'obtenir des informations qualitatives¹ et quantitatives² sur les échantillons analysés. La position d'une bande, caractéristique d'un groupe chimique, dépendra à la fois de la nature du vibreur et de son environnement. En effet, les liaisons entre atomes légers vibrent, par exemple, à plus haute fréquence que les liaisons entre atomes plus lourds. On considère, que lorsque la masse μ augmente, la fréquence ν diminue :

$$\text{Équation I.2-26} \quad \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad \mu = \frac{m_1 \times m_2}{m_1 + m_2}$$

où μ est la masse réduite, k est la constante de rappel de la liaison et m_1 , m_2 sont les masses des atomes liés.

L'intensité de la bande dépend quant à elle de la concentration, de la nature et de la polarité de la liaison. De nombreux facteurs externes ou internes à la molécule ont une influence sur la fréquence de vibration comme la taille, l'électronégativité des atomes environnants, les liaisons hydrogène, l'effet stérique, la conformation. Ces effets contribuent à une relation moins univoque entre densité optique et concentration puisqu'ils affectent le coefficient d'extinction molaire du chromophore, intervenant dans la loi de Beer-Lambert (Keirsse 2003). L'exploitation des spectres IR se basera sur des rapports d'intensité entre des échantillons similaires plutôt que sur des valeurs absolues. Finalement, l'analyse de spectres IR est complexe. De nombreuses tables sont disponibles pour aider à l'identification de bandes d'absorption inconnues, pour différents types d'échantillons. Les résultats permettront d'obtenir une image unique de la composition d'un échantillon (biomolécules par exemple). Toutefois, son utilisation n'est pas limitée à des molécules organiques.

¹ Les liaisons chimiques absorbent à des longueurs d'onde spécifiques. L'attribution des bandes à différents groupes chimiques est possible grâce à des tables IR.

² L'intensité des bandes d'absorption permet d'évaluer la concentration du groupe chimique caractéristique (loi de Beer-Lambert).

Ainsi, certains auteurs ont caractérisé la composition globale de surface de micro-organismes par IRTF (van der Mei 1989) et ont mis en évidence des différences significatives entre la composition de surface des bactéries à coloration de Gram positif et négatif mais aussi au sein de micro-organismes du même genre ou de la même famille.

L'IRTF s'avère donc être un outil utile et complémentaire à la description des appendices de surfaces bactériennes (protéines, polysaccharides), à l'origine d'une partie de leurs propriétés physico-chimiques de surface (van der Mei 1989). Différents modules permettent d'accéder aux spectres de vibration en transformant au minimum les échantillons. La réflexion totale atténuée (ATR) permet l'analyse d'une fine couche d'échantillon. Le principe du dispositif ATR est de faire subir au faisceau optique plusieurs réflexions à l'interface entre un cristal (indice de réfraction très élevé) et l'échantillon (indice plus faible). A chaque réflexion le faisceau pénètre de quelques microns dans l'échantillon. La somme des réflexions permet ainsi d'accroître la sensibilité.

Tableau I.2-2 : Attribution des bandes IR couramment observées dans les biofilms, d'après Boutaleb (2007).

Bandes (cm⁻¹)	Attributions spectrales
≈ 3300	vO-H et vN-H groupes avec liaison H (eau, protéines, adénine, guanine, cytosine)
2960	v _{as} CH ₃ (lipides)
2870	v _s CH ₃ (lipides)
2926	v _{as} CH ₂ (lipides)
2850	v _s CH ₂ (lipides)
2960–2850	vC-H aliphatiques (acides gras), élongation
1730	vC=O esters carbonyle (lipides, O-acétyle et COOH LPS)
1650–1535	vC=O, + δC=N (amide I et II), recouvrement avec δO-H (eau) à 1640cm ⁻¹
1620-1614	v _{as} COO ⁻ (LPS)
1485	δ _{as} (CH ₃) ₃ N ⁺
1467–1455	δ _{as} C-H dans groupement CH ₂ ou CH ₃ (aliphatiques)
1410	v _s COO ⁻
1407	δ _s (CH ₃) ₃ N
1396–1389	δC-H, v-CH ₃ (acides gras)
1260-1220	v _{as} PO ₂ (phosphodiester des phospholipides)
1250	vC-O (O-acétyl alginate)
1240–1235	vC-N (amide III)
1163	vC=O
1150–1000	vC-O, vPO ₂ ⁻ (modes complexes sucres).
1060	vC-OH (alginate)
965–760	vP-O-C, vP-O-P (phospholipides, chaînes ribosephosphate et pyrophosphate)
< 900	Région « fingerprint »

v : vibration d'élongation

δ : vibration de déformation ou de courbure

s : symétrique

as : asymétrique

I.2.5.3 Mesure des angles de contact de surface bactérienne

Dans le cas d'un solide (ou d'un micro-organisme), il n'existe pas de méthode directe et simple permettant d'accéder à son énergie de surface. La méthode la plus utilisée est la détermination des angles de contact. La mesure d'angles de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle θ de la tangente d'une goutte de dimensions définies d'un liquide sonde déposée sur le tapis de micro-organismes à analyser. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre de surface et de discriminer la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. La mesure de cet angle de contact θ permet d'accéder à différents types d'information :

- l'étalement plus ou moins spontané du solvant permet d'évaluer les différents types de mouillage. Lorsque $\theta = 0$, le liquide s'étale spontanément et le mouillage est considéré comme parfait. Le mouillage est considéré comme correct pour des valeurs d'angles de contact compris entre 0° et 90° et mauvais pour des valeurs comprises entre 90° et 180° . Enfin, pour $\theta = 180^\circ$, on considère le mouillage comme inexistant,
- l'utilisation d'eau comme solvant de mesure d'angles de contact permet de déduire le caractère hydrophobe (angle de contact supérieur à 90°) ou hydrophile (angle de contact inférieur à 20°) de la surface étudiée,
- l'utilisation de plusieurs solvants de référence, de caractéristiques énergétiques connues, permet d'accéder à l'énergie libre totale de la surface ainsi que ses composantes, tout en discriminant les composantes polaires et apolaires de cette énergie grâce aux équations de Young-Dupré et à différents modèles développés,
- l'observation de phénomène d'hystérésis entre l'angle de contact à l'avancée et au retrait de la goutte permet d'évaluer la non-homogénéité physique (rugosité, cohésion) ou chimique de la surface étudiée.

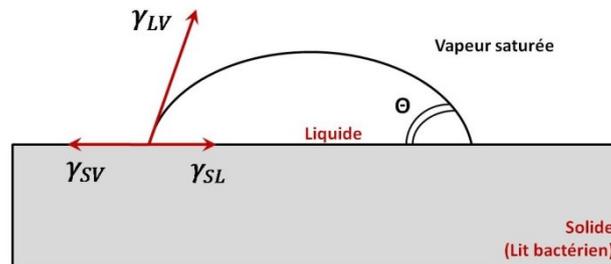


Figure I.2-9 : Angle de contact à l'équilibre sur une surface solide (lit bactérien).

L'équation de Young (1805) reliant l'énergie de surface du solide étudié au point triple (solide, liquide, vapeur) et l'angle de contact θ s'écrit suivant l'Équation I.2-27 :

$$\text{Équation I.2-27} \quad \gamma_{SL} = \gamma_{SV} - \gamma_{LV} \cos \theta \quad (\text{Equation de Young})$$

où γ_{SL} correspond à la tension interfaciale solide-liquide, γ_{SV} correspond à la tension interfaciale solide-vapeur et γ_{LV} correspond à la tension interfaciale liquide-vapeur.

Le terme γ_{SV} est sensiblement inférieur à l'énergie libre de surface γ_S . La différence entre ces deux énergies est appelée pression d'étalement de la vapeur π_e sur le solide.

$$\text{Équation I.2-28} \quad \pi_e = \gamma_S - \gamma_{SV}$$

Il est généralement considéré que la vapeur adsorbée est négligeable pour des matériaux de faible énergie de surface comme c'est le cas pour les polymères. L'équation de Young peut alors s'écrire :

$$\text{Équation I.2-29} \quad \gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (\text{Equation de Young simplifiée})$$

La relation de Dupré (1869) appliquée à une interface solide – liquide permet de relier le travail d'adhésion W_{SL} entre le solide et le liquide à la tension interfaciale γ_{SL} .

$$\text{Équation I.2-30} \quad W_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (\text{Equation de Dupré})$$

où γ_S correspond à l'énergie de surface du solide et γ_L correspond à la tension de surface du liquide.

La relation dite de Dupré-Yong est obtenue par la combinaison des Équation I.2-29 et Équation I.2-30 :

$$\text{Équation I.2-31} \quad W_{SL} = \gamma_L(1 + \cos \theta) \quad (\text{Equation de Dupré-Young})$$

A partir de cette équation, plusieurs théories et modèles ont été développés afin de calculer le travail d'adhésion. On peut citer la théorie de Fowkes (1963), le modèle géométrique d'Owens & Wendt (1969), l'équation d'état de Neumann *et al.* (1974), le modèle de Wu (1982) et l'approche Lifshitz-van der Waals/acide-base du modèle GVOC.

L'approche GVOC de van Oss *et al.* (1986) fait appel au concept des interactions acide/base de Lewis qui définit l'énergie de surface comme la somme des deux contributions suivantes :

$$\text{Équation I.2-32} \quad \gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB}$$

où γ^{LW} résulte des interactions de Lifshitz-van der Waals et γ^{AB} correspond aux interactions acide/base incluant la liaison hydrogène et tous les types de liaisons chimiques fortes qui mettent en jeu des recouvrements d'orbitales moléculaires ou atomiques (van Oss *et al.* 1988).

Dans ce modèle, les propriétés acide/base d'une surface sont décrites par un caractère acide γ^+ (accepteur d'électrons) et par un caractère basique γ^- (donneur d'électrons) au sens de Lewis. On considère alors que les interactions acide/base s'expriment à l'aide des relations suivantes :

$$\text{Équation I.2-33} \quad \gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_S^+}$$

$$\text{Équation I.2-34} \quad W_{SL}^{AB} = 2\sqrt{\gamma_L^- \gamma_S^+} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}$$

Le travail d'adhésion relatif aux interactions de Lifshitz-van der Waals s'exprime quant à lui selon l'Équation I.2-35 :

$$\text{Équation I.2-35} \quad W_{SL}^{LW} = 2\sqrt{\gamma_L^{LW} \gamma_S^{LW}}$$

L'utilisation de trois solvants différents, dont les composantes dispersives et polaires sont connues (Tableau I.2-3), permet d'accéder à l'énergie de surface du solide grâce à sa relation avec celles du liquide et de l'angle de contact de la goutte :

$$\text{Équation I.2-36} \quad W_{SL} = W_{SL}^{LW} + W_{SL}^{AB}$$

A partir des relations précédentes, il est possible de définir l'Équation I.2-37, équivalente à la relation de l'Équation I.2-38.

$$\text{Équation I.2-37} \quad W_{SL} = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right)$$

$$\text{Équation I.2-38} \quad \gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right)$$

D'après l'Équation I.2-31 de Dupré-Young.

Enfin, l'approche GVOC utilisée lors de la détermination des angles de contact formés entre un solvant et une surface considère que la composante résulte des interactions de Lifshitz-van der Waals γ^{LW} comme plus ou moins similaire à la composante dispersive de l'énergie de surface γ^D (van der Mei *et al.* 1991). On peut alors considérer, à partir de l'Équation I.2-38, la relation suivante :

$$\text{Équation I.2-39} \quad \gamma_L (1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^D \gamma_L^D} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right)$$

Tableau I.2-3 : Composantes de Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des trois liquides utilisés dans la méthode des angles de contact.

Liquides	γ_L^{LW} (mJ/m ²)	γ_L^+ (mJ/m ²)	γ_L^- (mJ/m ²)
Eau distillée	21,8	25,5	25,5
Diiodométhane	48,5	0	0
Formamide	39	2,3	39,6
Ethylène glycol	29	1,92	47
Glycérol	34	3,92	57,4
a-Bromonaphtalène	44,4	0	0
Cis-décane	32,2	0	0

I.2.5.4 Méthode de partition MATS (Microbial Adhesion To Solvents)

La méthode d'adhésion aux solvants MATS (Microbial Adhesion To Solvents) est une technique inspirée de la méthode d'adhésion aux hydrocarbures MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) (Rosenberg 1980). La méthode, développée par Bellon-Fontaine *et al.* (1996), est usuellement utilisée pour déterminer l'hydrophobicité relative de cellules microbiennes, ainsi que leur caractère acide-base au sens de Lewis.

La majorité des micro-organismes présente une hydrophobicité de surface plus ou moins importante. Certains auteurs considèrent que l'hydrophobicité de surface est le paramètre clé qui gouverne l'adhésion microbienne aux matériaux (Jana *et al.* 2000 ; Cappello & Guglielmino 2006). Plus l'hydrophobicité des cellules microbiennes augmente, plus l'adhésion devient importante (Pereira *et al.* 2000). Cependant, cette tendance n'est pas toujours confirmée (Bellon-Fontaine *et al.* 1990). Raisonner uniquement par rapport à l'hydrophobicité ne permet donc pas de comprendre les principaux facteurs contrôlant l'adhérence initiale microbienne.

Eu égard à ces observations, l'affinité microbienne mesurée par la méthode MATS est considérée comme la résultante d'une combinaison d'interactions électrostatiques, de van der Waals et d'interactions acide/base de Lewis. La méthode est basée sur la comparaison de l'affinité d'une souche microbienne pour un solvant apolaire et un solvant monopolaire. Le solvant monopolaire peut être accepteur d'électrons (acide au sens de Lewis) ou donneur d'électrons (basique au sens de Lewis) mais les deux types de solvants doivent obligatoirement posséder la même énergie libre de surface liée au caractère Lifshitz-van der Waals afin de s'affranchir de ces interactions. Par ailleurs, l'utilisation d'une solution aqueuse de force ionique élevée (tampon) permet de s'affranchir des interactions électrostatiques. L'affinité microbienne mesurée par la méthode MATS est donc essentiellement corrélée aux interactions acide/base de Lewis. Sur cette base, quatre solvants doivent être employés, fonctionnant par paire de type polaire/apolaire : le couple chloroforme (acide de Lewis)/hexadécane et le couple acétate d'éthyle (base de Lewis)/décane.

Pratiquement, la méthode MATS consiste à mettre en contact une suspension bactérienne de densité optique (DO) connue avec un solvant.

Après une brusque agitation, des micro-gouttelettes de solvant se forment, sur lesquelles les bactéries y adhèrent plus ou moins selon l'hydrophobicité de leur surface. Il suffit alors de mesurer la DO de la phase aqueuse et de déterminer le pourcentage d'adhésion au solvant, à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Équation I.2-40} \quad \text{Affinité (\%)} = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$$

où A_0 correspond à la densité optique d'une suspension bactérienne ajustée à une densité optique de 0,8 à 400 nm et A_1 correspond à la densité optique (mesurée à 400 nm) de la phase aqueuse après décantation de la suspension bactérienne et des différents solvants.

L'hydrophobicité de surface se traduit par le pourcentage de cellules ayant adhéré aux solvants apolaires hexadécane et décane. La surface des cellules est considérée hydrophobe lorsque ce pourcentage est supérieur à 50 % et relativement hydrophile dans le cas contraire.

La détermination du caractère acide/base de Lewis des cellules microbiennes est basée sur la comparaison de l'affinité des cellules pour les solvants polaires et apolaires qui constituent chacun deux couples (Bellon-Fontaine *et al.* 1996). La différence entre le pourcentage d'adhésion au chloroforme et celui de l'hexadécane permet d'évaluer le caractère donneur d'électrons des cellules microbiennes. Si cette différence est positive, on considère que la surface de la souche présente un caractère basique de Lewis. La différence entre le pourcentage d'adhésion à l'acétate d'éthyle et au décane permet d'évaluer le caractère accepteur d'électrons des cellules microbiennes. Si cette différence est positive, le caractère de surface des souches étudiées est jugé acide au sens de Lewis.

Tableau I.2-4 : Composantes de Lifshitz-van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des trois liquides utilisés pour le test MATS d'après Bellon-Fontaine *et al.* (1996).

Solvants	γ_L^{LW} (mJ/m ²)	γ_L^+ (mJ/m ²)	γ_L^- (mJ/m ²)
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,7	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0

I.2.6 La Chromatographie Gazeuse Inverse : un nouvel outil pour l'analyse des propriétés globales de surface de micro-organismes

Peu de méthodes sont susceptibles d'aider à la caractérisation des propriétés de surface de matériaux grâce à l'utilisation de milieux gazeux. Dans ce cas, il s'agit de méthodes basées sur l'adsorption de molécules à l'état gazeux sur la surface à analyser. Parmi ces techniques de caractérisation de surface, la Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI) est la plus couramment utilisée.

Apparue dans les années 1970 (Conder & Young 1979), cette dernière s'est révélée très efficace pour l'étude des propriétés de surfaces de solides divisés¹. De nombreuses études ont été menées par CGI sur des solides variés et correspondant à des domaines d'étude hétérogènes : l'agro-alimentaire (Riganakos *et al.* 1993), la chimie fine (Buckton *et al.* 1999), la chimie minérale (Comte 2004), les cosmétiques et la pharmacologie (Levoguer *et al.* 2000), la papeterie (Kazayawoko *et al.* 1997) ou encore la pétrochimie (Herruzo *et al.* 1999).

I.2.6.1 Généralités

La chromatographie est une technique couramment employée à des fins analytiques pour séparer et analyser un mélange de constituants entraînés au travers d'une colonne constituée d'une phase stationnaire, par un flux d'une phase mobile qui peut être liquide ou gazeuse. En CGI, méthode basée sur l'adsorption de molécules de gaz, le terme inverse décrit simplement le principe contraire à la chromatographie analytique. Ce sont ainsi les caractéristiques de surface de la phase stationnaire, constituant le solide à analyser, qui intéressent l'expérimentateur (Figure I.2-10). L'injection de solutés ou molécules sondes, choisis en fonction de leur capacité à interagir avec la phase stationnaire, va permettre d'accéder à des grandeurs thermodynamiques caractéristiques des interactions développées entre la surface d'un solide et les molécules sondes utilisées. Le temps de rétention t , qui reflète la durée que met chaque molécule sonde à traverser la phase stationnaire, traduit ainsi l'affinité des solutés pour le solide étudié, en tenant compte d'un ensemble d'interactions, toutes décrites précédemment : les interactions de Lifshitz-van der Waals, les interactions acide/base de Lewis ou les interactions électrostatiques.

¹ Constitués de particules de petites tailles.

Le temps de rétention est une fonction complexe qui prend en compte le nombre de sites d'adsorption du solide étudié, leur énergie d'interaction et leur rayon de capture. Dans le cas de solides énergétiquement hétérogènes¹, les sites les plus énergétiques vont contribuer majoritairement au phénomène de rétention et donc au temps de rétention. Ce dernier reflète ainsi majoritairement les interactions entre ces sites et la molécule sonde.

Selon la nature de la sonde utilisée², il est donc possible d'accéder à différentes grandeurs décrivant l'énergie de surface, comme les composantes dispersive et spécifique de l'énergie de surface, les composantes acide/base ou encore l'indice de morphologie de la surface. Toutefois, les interactions échangées entre la surface et les molécules sondes dépendent fortement des quantités de ces dernières. C'est ce qui distingue les deux méthodes couramment employées en Chromatographie Gazeuse Inverse, celle en Dilution Infinie (CGI-DI) et celle à Concentration Finie (CGI-CF).

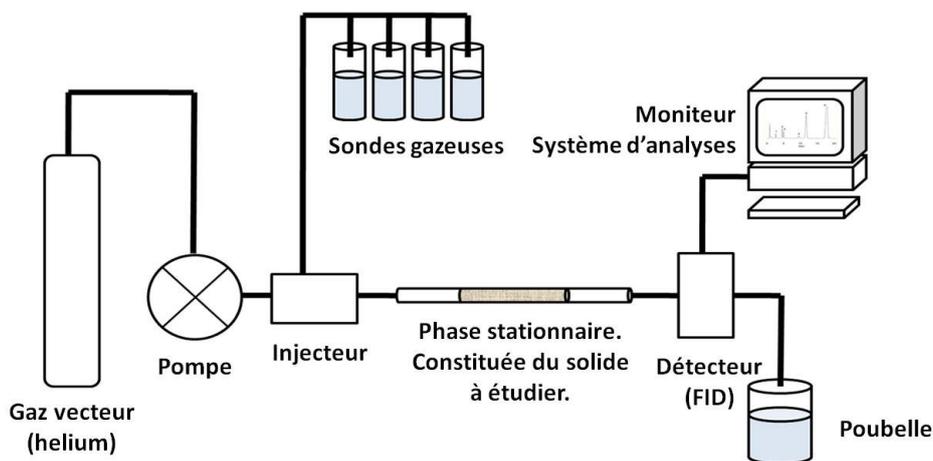


Figure I.2-10 : Système de la Chromatographie Gazeuse Inverse.

¹ Cas le plus fréquent.

² Polaire, apolaire, linéaire, ramifiée, cyclique.

En concentration finie, les quantités de sondes injectées étant plus importantes, on considère que tous les sites énergétiques contribuent à l'adsorption des molécules sondes. Toute la surface étant accessible, il est possible en faisant varier le taux de recouvrement de tracer des isothermes d'adsorption, et ce pour un grand nombre de molécules organiques. Ainsi, les fonctions de distribution des sites énergétiques de surface du solide étudié peuvent être déduites et l'hétérogénéité énergétique de surface de ce solide quantifiée.

La CGI en dilution infinie consiste quant à elle en l'injection de très faibles quantités de molécules sondes, l'une après l'autre ou en série (Tisserand 2007). L'adsorption des molécules sondes est réversible à la surface du support étudié et celles-ci ne recouvrent qu'une partie limitée de la surface du solide.

Par ailleurs les quantités de molécules sondes injectées sont si faibles que les interactions sondes-sondes sont considérées comme négligeables. Dans ces conditions, les quantités injectées ne suffisent pas à former une fraction notable de la monocouche à la surface du solide. La quantité adsorbée est directement proportionnelle à la quantité de soluté dans la phase vapeur et obéit à la loi de Henry : la concentration maximale d'un gaz en solution, en équilibre avec une atmosphère contenant ce gaz, est proportionnelle à la pression partielle de ce gaz en ce point.

I.2.6.2 Grandeurs expérimentales

La grandeur mesurée expérimentalement est le temps de rétention t_r , temps que met la molécule sonde pour traverser la colonne. Chaque sonde a son propre temps de rétention qui dépend de ses interactions avec le solide étudié. Un gaz inerte, le méthane, permet de mesurer le temps mort de la colonne t_0 , ce dernier ne s'adsorbant pas. On définit ainsi pour chaque sonde le temps net de rétention t_n :

$$\text{Équation I.2-41} \quad t_n = t_r - t_0$$

La Figure I.2-11 représente un chromatogramme classique présentant le pic de méthane et celui d'une sonde quelconque injectée.

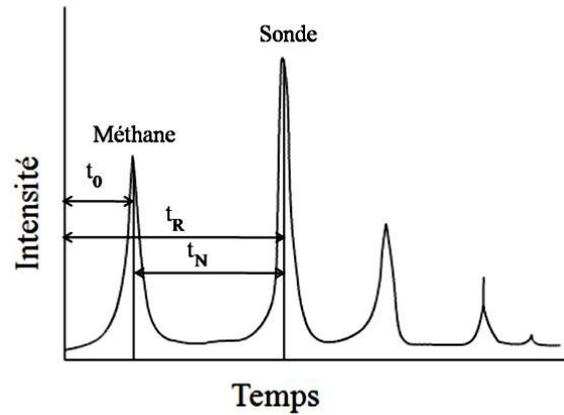


Figure I.2-11 : Détermination du temps net de rétention.

Le volume net de rétention V_n , indispensable pour déterminer les grandeurs thermodynamiques citées précédemment, correspond au volume de gaz vecteur qui traverse la colonne depuis l'introduction de la sonde jusqu'à l'obtention du maximum du pic, auquel on soustrait le volume de rétention du méthane V_0 . Il est lié au temps de rétention par l'équation suivante :

$$\text{Équation I.2-42} \quad V_n = D_c(t_r - t_0)$$

considérant D_c , le débit corrigé du gaz vecteur afin d'éliminer des variations de débits liées à des problèmes de surpression de la colonne :

$$\text{Équation I.2-43} \quad D_c = jD_m \left(1 + \frac{P_{H_2O}}{P_{atm}}\right) \frac{T_c}{T_a}$$

où D_m correspond au débit mesuré du gaz vecteur à la sortie de la colonne, T_c et T_a correspondent respectivement à la température de la colonne et à la température ambiante au moment de la mesure du débit et P_{atm} et P_{H_2O} correspondent respectivement à la pression atmosphérique au moment de l'analyse et la pression de vapeur saturante de l'eau à T_a . Le coefficient j de James-Martin¹ (James & Martin 1952) tient compte de la compressibilité du gaz dans la colonne sous l'action de la perte de charge ΔP dans la colonne :

$$\text{Équation I.2-44} \quad j = \frac{3 \left(1 + \frac{\Delta P}{P_{atm}}\right)^2 - 1}{2 \left(1 + \frac{\Delta P}{P_{atm}}\right)^3 - 1}$$

¹ Ce coefficient est toujours inférieur ou égal à 1 (Conder & Young 1979).

On utilise également le volume spécifique de rétention V_G qui représente le volume de rétention, normalisé à 1 gramme de solide et à une température de 0°C (Comte 2004). Il permet notamment de comparer des données obtenues sur des colonnes ayant des caractéristiques différentes. En effet, le débit mesuré est très souvent en CGI pris à la température ambiante T_a qui diffère de celle de la colonne. Pour normaliser les mesures de volumes de rétention réalisées aux différentes températures, on rapporte par convention tous les débits à la température de 0°C.

$$\text{Équation I.2-45} \quad V_G = \frac{V_n}{m_a} \frac{273}{T_c}$$

où V_n correspond au volume net de rétention et m_a correspond à la masse de solide.

De manière générale, le volume de rétention spécifique est supposé indépendant :

- de la surpression engendrée par la colonne,
- de la masse de la phase stationnaire,
- de la nature du gaz vecteur et de sa pression.

I.2.6.3 La thermodynamique appliquée à la CGI

I.2.6.3.1 L'enthalpie libre d'adsorption

Les analyses étant réalisées en mode de dilution infinie, il est possible d'appliquer la loi de Henry qui stipule que la quantité de molécules adsorbées est proportionnelle à la surface totale de la phase stationnaire (A) lorsque la concentration du soluté tend vers zéro (Planinsek *et al.* 2003 ; Comte 2004). Ainsi, on a :

$$\text{Équation I.2-46} \quad V_N = A \times k'$$

où k' correspond à la constante de Henry ou constante de partage et A correspond à la surface totale de la phase stationnaire.

L'équation générale de la CGI-DI exprime la variation d'enthalpie libre standard d'adsorption ΔG_a° , qui accompagne le passage de la molécule de l'état gazeux à l'état absorbé.

Cette variation d'enthalpie libre peut être exprimée en fonction du volume net de rétention de la sonde injectée :

$$\text{Équation I.2-47} \quad \Delta G_a^\circ = -RT \ln(K') = -RT \ln xk' = -RT \ln(V_n) + (C')$$

où K' correspond à la constante d'adsorption à l'équilibre, R correspond à la constante de gaz, et C' correspond à une constante dépendante de l'aire de la surface développée par le solide et de l'état de référence de la molécule adsorbée choisie.

On peut rencontrer dans la littérature deux états pris arbitrairement comme référence : celui de Kemball & Rideal (1946) et celui de de Boer & Kruyer (1952). Ces états de référence sont longuement répertoriés dans la littérature (Comte 2004 ; Tisserand 2007). De manière générale et d'un point de vue pratique, on s'affranchit de cette constante (Brendlé & Papirer 1998). Dans cette étude, les enthalpies libres d'adsorption sont calculées à partir du volume spécifique (Équation I.2-45) de rétention tout en négligeant la constante C' .

I.2.6.3.2 Détermination des composantes de l'énergie de surface d'un micro-organisme

Les énergies de surface d'un solide jouent un rôle prépondérant dans l'explication du phénomène d'adsorption (Brendlé & Papirer 1998 ; Comte 2004). Différentes forces d'interactions peuvent exister suivant la nature de la surface du solide, mais également en fonction de la nature chimique de l'adsorbable. En première approximation, il est possible de considérer les micro-organismes comme des particules colloïdales relativement régulières, les approchant de solides divisés très fins.

L'énergie de surface déterminée par CGI peut être considérée, pour l'adhésion microbienne, comme la somme de plusieurs composantes, l'une liée aux forces dispersives (London) et l'autre aux forces spécifiques (Fowkes 1962) :

$$\text{Équation I.2-48} \quad \gamma_S = \gamma_S^D + \gamma_S^{SP}$$

où γ_S^D correspond à la composante liée aux forces dispersives de London et γ_S^{SP} correspond à la composante liée aux forces spécifiques.

Les études de Fowkes & Mostafa (1978) sur l'adsorption de surface ont conduit à la conclusion que le travail d'adhésion W_a entre un solvant et un solide est principalement gouverné par des interactions dispersives de London (D) et acide-base de Lewis (AB). Généralement, ces interactions sont considérées comme indépendantes et, ainsi, additives :

$$\text{Équation I.2-49} \quad W_a = W_a^D + W_a^{AB}$$

I.2.6.3.2.1 La composante dispersive de l'énergie de surface

Selon Fowkes (1962), le travail d'adhésion W_a^D entre deux surfaces échangeant des interactions uniquement de type dispersif se définit par l'Équation I.2-50 :

$$\text{Équation I.2-50} \quad W_a^D = 2\sqrt{\gamma_S^D \gamma_L^D}$$

où γ_S^D et γ_L^D correspondent respectivement aux composantes dispersives de l'énergie de surface du solide et de la molécule sonde.

Généralement, le travail d'adhésion est couplé à l'enthalpie libre d'adsorption. Or, lorsque les molécules sondes injectées sont du type alcane (absence de dipôles permanents), la variation de l'enthalpie libre standard d'adsorption ΔG_a° est égale à celle de l'enthalpie libre d'adsorption due aux forces de London ΔG_a^D uniquement. En effet, pour ces composés non polaires, on considère que les interactions de surface sont purement de nature dispersive.

$$\text{Équation I.2-51} \quad \Delta G_a^\circ = \Delta G_a^D = -NaW_a^D$$

où a correspond à l'aire de la molécule adsorbée et N correspond à la constante d'Avogadro.

La combinaison des Équation I.2-47 et Équation I.2-51 permet d'obtenir la relation suivante :

$$\text{Équation I.2-52} \quad RT \ln V_n = 2Na\sqrt{\gamma_S^D \gamma_L^D}$$

Pour s'affranchir de l'état de référence, Dorris & Gray (1980) ont montré que les enthalpies libres standard d'adsorption dues aux forces de London, obtenues par injection d'une série de n -alcane, variaient linéairement avec le nombre n d'atomes de carbone de la molécule d'alcane. A partir de cette observation, il est possible de calculer l'enthalpie libre d'adsorption d'un groupement méthylène via l'injection de séries d'alcane linéaires.

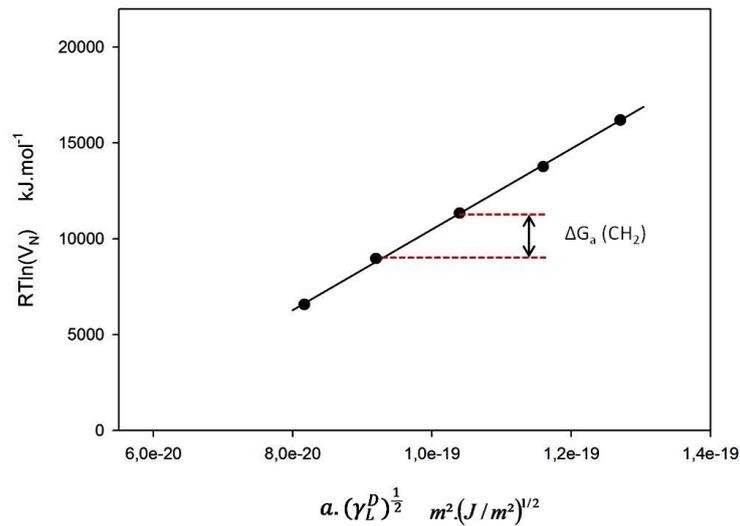


Figure I.2-12 : Variation de l'enthalpie libre d'adsorption en fonction du nombre d'atomes de carbone des alcanes linéaires injectés.

Schultz *et al.* (1987) ont proposé d'utiliser la grandeur $a(\gamma_L^D)^{0,5}$ comme échelle de comparaison où a représente l'aire occupée par une molécule d'alcane sur la cellule et γ_L^D correspond à la tension de surface du même alcane à l'état liquide. Il est important de noter que d'autres modèles peuvent être portés sur l'échelle des abscisses comme :

- le modèle de Saint Flour & Papirer (1983) qui utilise le logarithme de la pression de vapeur $\log(P^\circ)$ saturante des sondes à la température de la colonne,
- le modèle de Donnet *et al.* (1991) basé sur la polarisabilité des molécules sondes $(\alpha_0 \sqrt{h\nu})$,
- le modèle de Brendlé & Papirer (1998) qui utilise le paramètre χ_T .

En reportant l'enthalpie libre d'adsorption en fonction des indices de topologie des alcanes (nombre d'atomes de carbone), il est possible de tracer la droite des n -alcanes. La pente correspond alors à la variation d'enthalpie libre par groupe méthylène :

$$\text{Équation I.2-53} \quad \Delta G_a(\text{CH}_2) = -RT \ln \frac{V_n(n+1)}{V_n(n)}$$

D'autre part, pour un système composé de deux solides, l'un quelconque et le second formé uniquement de groupements méthylène, on peut déterminer à partir de l'Équation I.2-51 :

$$\text{Équation I.2-54} \quad \Delta G_a(\text{CH}_2) = -N_{a(\text{CH}_2)} W_{a(\text{CH}_2)}$$

En considérant :

$$\text{Équation I.2-55} \quad W_{a(\text{CH}_2)} = 2\sqrt{\gamma_S^D \gamma_{\text{CH}_2}}$$

où a est l'aire occupée par une molécule d'alcane sur une cellule et γ_{CH_2} correspond à l'énergie de surface d'un solide constitué uniquement de groupements méthylène.

On a ainsi :

$$\text{Équation I.2-56} \quad \Delta G_a(\text{CH}_2) = -2N_{a(\text{CH}_2)}\sqrt{\gamma_S^D \gamma_{\text{CH}_2}}$$

La composante dispersive de l'énergie de surface d'un solide (due aux interactions de London uniquement) s'exprime (en mJ/mol) par la relation suivante :

$$\text{Équation I.2-57} \quad \gamma_S^D = \frac{(\Delta G_{\text{CH}_2})^2}{4N^2 a^2 \gamma_{\text{CH}_2}}$$

En conclusion, l'étude de l'adsorption de molécules linéaires d'alcane permet alors de déterminer la composante dispersive de l'énergie de surface. Si l'on considère une cellule microbienne comme une particule colloïdale, il est possible d'évaluer sa capacité à échanger des interactions de London. Plus γ_S^D sera importante et plus la surface microbienne sera capable d'échanger ces interactions. De manière générale, on considère que les forces de London sont très faibles pour des molécules polaires, en comparaison avec les autres forces intermoléculaires (interactions ioniques, force de Keesom). Ainsi, plus les forces de London sont importantes, plus l'on peut considérer la molécule ou la surface étudiée comme moins polaire (Tisserand 2007). La CGI permet donc d'évaluer et classer la polarité des surfaces microbiennes et donc par voie de conséquence le caractère hydrophile/hydrophobe de leur surface.

1.2.6.3.2.2 La composante spécifique de l'énergie de surface

Les interactions spécifiques ont très souvent comme origine, en l'absence d'interactions métalliques ou magnétiques, des interactions de type acide/base au sens de Lewis. Expérimentalement, pour estimer ces enthalpies libres spécifiques d'adsorption, on injecte des molécules acides ou basiques afin de sonder respectivement le caractère basique ou acide de la surface du solide étudié. L'enthalpie libre d'adsorption mesurée correspond à la somme des interactions dispersives et spécifiques :

$$\text{Équation I.2-58} \quad \Delta G_a^\circ = \Delta G_a^D + \Delta G_a^{SP}$$

A partir de la droite obtenue lors de l'injection de molécules sondes d'alcane linéaires (Figure I.2-13), par simple différence entre l'énergie totale obtenue par injection de la sonde polaire et celle liée aux interactions dispersives échangées entre la surface du solide et la molécule sonde apolaire, il est possible d'estimer la composante spécifique.

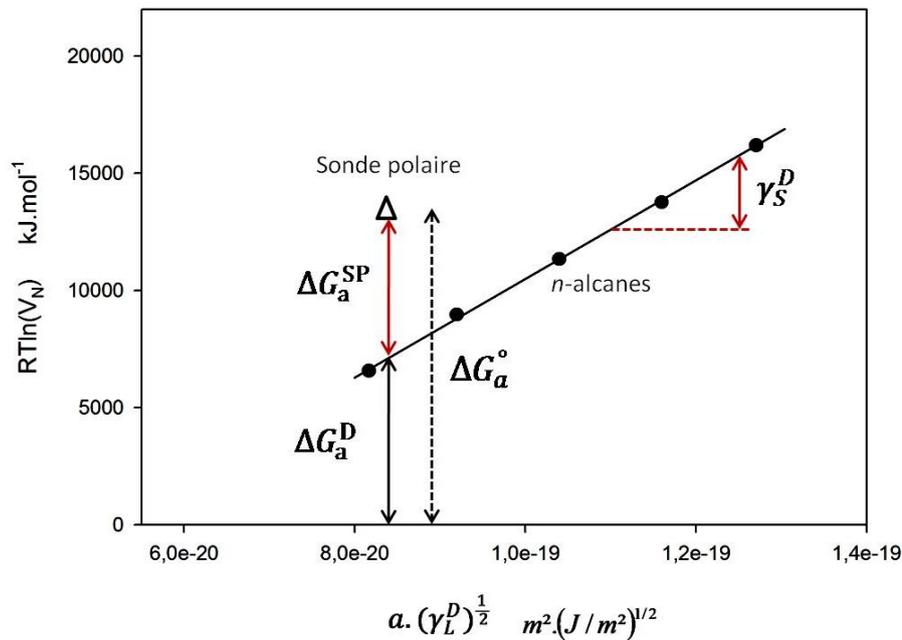


Figure I.2-13 : Détermination de l'enthalpie libre d'adsorption spécifique.

Dans cette détermination, la molécule sonde polaire est en fait assimilée à une molécule hypothétique d'alcane qui échangerait les mêmes interactions dispersives. Cette méthode est basée sur l'expression du travail d'adhésion estimé par Fowkes (1962) :

$$\text{Équation I.2-59} \quad W_a = 2\sqrt{\gamma_S^D \gamma_L^D} + W_a^{SP}$$

$$\text{Équation I.2-60} \quad \Delta G_a = -NaW_a = -(2Na\sqrt{\gamma_L^D \gamma_L^{SP}} + \Delta G^{SP})$$

La limite de cette méthode réside sur la difficulté d'accéder à l'aire de la molécule qui, de plus, varie en fonction de la nature du solide sur lequel la molécule s'adsorbe et la température. D'autres méthodes existent, qui ont été préalablement citées (cf. I.2.6.3.2.1, p. 102).

I.2.6.3.2.3 Les constantes d'acidité et de basicité

Les interactions acide-base interviennent très fréquemment dans de nombreux phénomènes comme la dispersion d'un solide dans un milieu organique, la mouillabilité, la catalyse, le renforcement ou encore l'adhésion. Pour quantifier les interactions acide/base de Lewis, il suffit d'injecter des molécules sondes acide ou basique au sens de Lewis permettant ainsi d'estimer l'enthalpie d'adsorption de ces molécules sondes. Deux approches sont envisageables pour quantifier le caractère acide/base d'une surface : l'approche de Drago (1965) et l'approche de Gutmann (1966).

I.2.6.3.2.3.1 Approche de Drago

Ce modèle relie l'enthalpie d'adsorption de la molécule sonde acide ou basique à un paramètre électrostatique E et à un paramètre covalent C défini pour le solide et la sonde.

$$\text{Équation I.2-61} \quad -\Delta H^{AB} = E_A E_B + C_A C_B$$

Où A et B représentent respectivement l'acidité et la basicité.

Le seul désavantage de cette approche est qu'elle ne tient pas compte du caractère amphotère possible des molécules sondes.

1.2.6.3.2.3.2 Approche de Gutmann

Le concept de donneur-accepteur de Gutmann est fréquemment appliqué dans les études de CGI. Il relie l'enthalpie d'adsorption à deux paramètres qui symbolisent la capacité à la fois du solide et de la sonde à donner ou à accepter des électrons. Une sonde est alors classée par seulement deux paramètres, le nombre donneur (DN) et le nombre accepteur (AN). Ces paramètres décrivent respectivement la nature basique et acide de la sonde au sens de Lewis. La valeur de DN (kcal/mol) correspond à l'enthalpie de formation d'un composé quand la base en question réagit avec l'acide de Lewis de référence SbCl_5 dans une solution de 1,2-dichlorométhane. Malheureusement, aucun système de référence similaire approprié n'a été trouvé pour la caractérisation des acides. Ainsi, la valeur de AN a été mesurée comme un changement induit relatif dans le spectre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ^{31}P de la base de référence Et_3PO_4 dissoute dans l'acide étudié. Cette approche est partiellement incohérente puisque les valeurs de DN sont exprimées en Kcal/mol tandis que ceux de AN sont sans dimension.

Les valeurs de AN ont donc été corrigées. Fowkes (1962) a apporté une première correction pour éliminer la contribution des forces dispersives au changement du spectre RMN ^{31}P . Ensuite, les valeurs de AN ont été recalculées en prenant comme valeur de référence, la valeur AN de Et_3PO_4 égale à 40 Kcal/mole. Ces deux étapes ont permis de définir un nombre accepteur AN* plus cohérent en raison de son unité identique à DN.

En conclusion, l'utilisation de molécules sondes à caractère acide ou basique au sens de Lewis permet de déterminer l'affinité de la surface pour ces différents caractères. Si l'on considère ce solide comme une cellule microbienne (particule colloïdale), il est possible d'évaluer la composante spécifique de son énergie de surface et définir si la surface est plutôt acide (les molécules sondes basiques adhèrent plus longtemps à sa surface) ou basique (les molécules sondes acides adhèrent plus longtemps à sa surface) au sens de Lewis. L'affinité plus ou moins importante de molécules sondes à AN ou DN élevés (acides ou bases purs de Lewis) permettra de classer le caractère acide/base de Lewis des surfaces de différentes souches microbiennes.

MATERIEL ET METHODES

PARTIE II



Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

PARTIE II



- II.1 - Caractérisation de substances polymériques d'origine algale
 - II.1.1 - Prélèvements d'échantillons *in situ*
 - II.1.2 - Extraction et purification de Substances Polymériques Extracellulaires
 - II.1.3 - Analyses biochimiques de SPE par spectrophotométrie
 - II.1.4 – Composition osidique : identification et quantification
 - II.1.5 - Propriétés antimicrobiennes

- II.2 - Détermination des propriétés de surface de micro-organismes
 - II.2.1 - Préparation des cellules bactériennes
 - II.2.2 - Méthodes classiques d'analyse des propriétés globales de surface de micro-organismes
 - II.2.3 - Détermination des propriétés de surface de micro-organismes par Chromatographie Gazeuse Inverse

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 CARACTERISATION DE SUBSTANCES POLYMERIQUES D'ORIGINE ALGALE

II.1.1 Prélèvements d'échantillons *in situ*

II.1.1.1 Echantillons de macro-algues

Des échantillons de l'algue *Chaetomorpha aerea* ont été prélevés au sein de bassins ostréicoles de l'île d'Oléron (Côte Atlantique, France) en période hivernale (janvier 2009) (Figure II.1-1, zone 1). Les échantillons d'algues ont été lavés, séchés, broyés et conservés à 4°C sous atmosphère inerte, à l'obscurité.

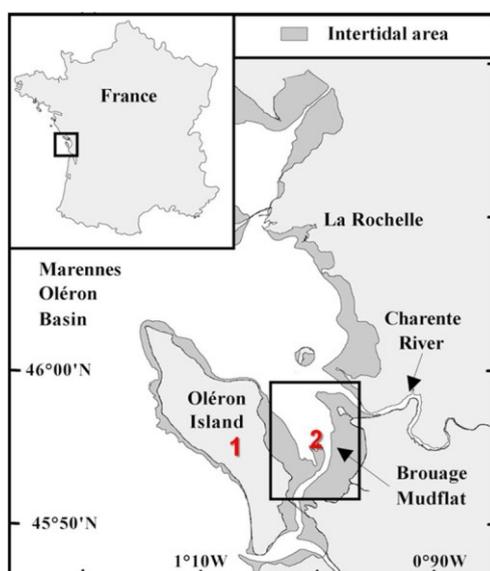


Figure II.1-1 : Station de prélèvements des échantillons de sédiment.

II.1.1.2 Echantillons de sédiment riche en micro-algues

Les échantillons de sédiment utilisés dans cette étude ont été collectés dans la baie de Marennes-Oléron à marée basse (Côte Atlantique, France) au cours de deux campagnes de prélèvements ; la première en hiver (16-20 février 2008) et la deuxième en été (17-25 juillet 2008) (Figure II.1-1, zone 2). La zone de prélèvements a été découpée en différentes parcelles (4 m²) séparées par des couloirs (2 m). Chaque jour, trois parcelles ont été sélectionnées au hasard afin de représenter au mieux l'hétérogénéité spatiale.

Au cours de l'émersion (toutes les heures) et pour chaque parcelle, trois carottes de sédiment (20 cm de diamètre) ont été prélevées. Les premiers centimètres (1 cm) des trois carottes ont ensuite été collectés puis mélangés. Ces cœurs de sédiment frais ont été immédiatement rapatriés afin d'extraire les Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) présentes.

II.1.1.3 Paramètres environnementaux

Au cours des campagnes de prélèvements, de nombreux facteurs abiotiques ont été mesurés. La luminosité a été mesurée via un luxmètre Li-Cor (Biosciences, France) et quantifiée toutes les minutes durant les périodes de prélèvements. Afin de séparer et quantifier les bactéries présentes dans le sédiment, les échantillons ont été incubés dans du pyrophosphate (0,01 M pendant au moins 30 min) et soniqués (60 W, 30 sec) via un sonicateur Bioblock 72442 Vibra Cell (Fisher Scientific, France). Les bactéries ont été marquées en utilisant du 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (2500 $\mu\text{g.L}^{-1}$), filtrés sur des filtres noirs Nucleopore de 0,22 μm (Porter & Feig 1980) puis dénombrées par microscopie optique (Carl Zeiss Axioskop, Fisher Scientific, France). Les concentrations en chlorophylle *a* dans le sédiment ont quant à elles été mesurées par méthode fluorométrique (Lorenzen 1966). Ces manipulations ont été réalisées en routine par l'équipe du Prof. Christine Dupuy (Laboratoire LIENSs, Equipe DYFEA, La Rochelle, France).

II.1.2 Extraction et purification de Substances Polymériques Extracellulaires

II.1.2.1 Polysaccharides extractibles à partir du mucilage de la macro-algue *Chaetomorpha aerea*

Principe : différentes substances polymériques peuvent être extraites de cette macro-algue, en fonction de leurs structures et de leurs localisations (phase squelettique, phase matricielle). L'obtention de polysaccharides extracellulaires purs nécessite différents traitements physico-chimiques. Un lavage préalable de la macro-algue permet d'éliminer les impuretés qui souillent l'échantillon. Le broyage de la matière première assure une bonne surface d'échange lors de l'ajout de solvants. L'utilisation de solvants apolaires permet d'extraire les lipides ainsi que la majorité des pigments présents.

L'extraction des polysaccharides extracellulaires se fait le plus souvent à chaud dans l'eau ou en mélange hydro-alcoolique de part leur hydro-solubilité importante. De manière générale, le pH est souvent proche de la neutralité afin d'éviter une possible détérioration de certaines liaisons chimiques. Enfin, les protéines libres sont dénaturées par l'utilisation de sulfate de zinc en présence d'une base forte, induisant leur précipitation.

Matériel et réactifs : *Chaetomorpha aerea* broyée et séchée. Chloroforme (Carlo Erba, 438601). Hexane (Sigma-Aldrich 650552). Ethanol (Carlo Erba 524125). Sulfate de zinc (Sigma-Aldrich 96495). Hydroxyde de baryum (Sigma-Aldrich 433373). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Membranes à dialyse Spectra/Por, seuil de coupure 6-8 kDa (VWR 734-0663). Système de filtration sur Büchner. Entonnoir filtrant porosité 2 (VWR 511-1342). Centrifugeuse (Sigma 3-18K/Rotor Sigma 12159-H, Fisher Bioblock Scientific, France). Lyophilisateur (HETO LyoPro 3000, France).

Mode opératoire : Peser 5 g de *Chaetomorpha aerea* broyée et séchée et ajouter 200 mL d'un mélange chloroforme/hexane (2/1 v/v). Mélanger fortement puis laisser reposer quelques minutes. Centrifuger ensuite la suspension à 8000 g pendant 10 min à 4°C. Jeter le surnageant et reprendre le culot avec un mélange chloroforme/hexane (2/1 v/v). Mélanger à nouveau fortement. Laisser reposer quelques minutes puis centrifuger la suspension à 8000 g pendant 10 min à 4°C. Jeter le surnageant et ajouter 100 mL d'eau ultra-pure à 40°C. Mettre sous agitation à 40°C pendant 24 h. Après extraction, filtrer le mélange sur un entonnoir filtrant de porosité 2 sous vide léger, selon la méthode d'Ernst Büchner. Récupérer le filtrat, congeler à -80°C puis lyophiliser. Après lyophilisation, suspendre l'échantillon avec 20 mL d'eau ultra-pure à 60°C. Ajouter 5 mL d'une solution aqueuse de sulfate de zinc à 5 %, agiter puis laisser reposer 5 min. Ajouter 5 mL d'une solution aqueuse d'hydroxyde de baryum à 0,3N. Agiter puis laisser reposer 5 minutes. Centrifuger à 5000 g pendant 10 min à 4°C puis récupérer le surnageant. Filtrer le surnageant puis ajouter 50 mL d'eau ultra-pure. Centrifuger de nouveau à 5000 g pendant 10 min à 4°C. Récupérer le surnageant et congeler à -80°C. Lyophiliser la solution enrichie en polysaccharides. Préparer une solution aqueuse du polysaccharide à 10 g/L. Placés 5mL dans une membrane à dialyse (seuil de coupure 6-8 kDa). Fermer la membrane et la placer dans un erlenmeyer contenant 500 mL d'eau ultra-pure. Placer le système sous agitation à 4°C dans le noir durant 48 h. Récupérer la fraction interne enrichie en polysaccharides. Récupérer la fraction externe riche en sels. Lyophiliser les deux fractions.

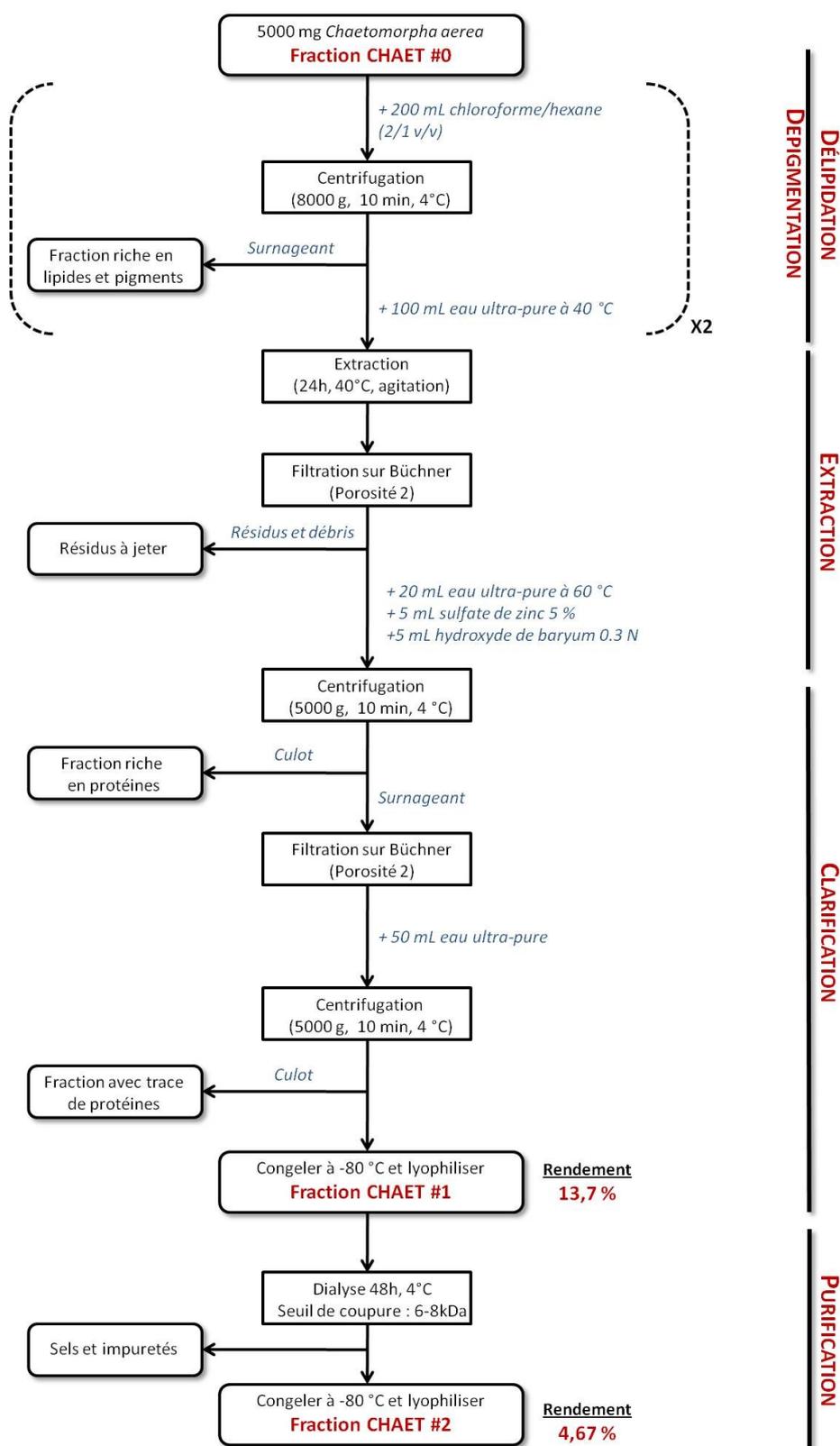


Figure II.1-2 : Méthode d'extraction et de purification mise au point pour l'étude de polysaccharides pariétaux d'origine algale.

II.1.2.2 SPE extractibles à partir de sédiments riches en diatomées

Principe : le protocole utilisé a été développé et largement décrit par Takahashi *et al.* (2009). De manière générale, la méthode d'extraction permet de récolter trois types de fraction séparées elles-mêmes en fonction du poids moléculaire des composés (Tableau II.1-1). La Figure II.1-3 propose une hypothèse de localisation des six fractions de SPE extraites développée à partir d'un modèle décrit pour des biofilms à dominante microphytobenthique par Underwood et Paterson (2003).

Tableau II.1-1 : Fractions polymériques collectées par l'utilisation du protocole d'extraction développé par Takahashi et al. (2009).

Types de fraction	Poids Moléculaire des polymères	Type d'extraction
Colloïdale	BPM	Solubilité dans l'eau
	HPM*	
Capsulaire	BPM	Propriétés ioniques (Dowex)
	HPM*	
Résiduelle/intracellulaire	BPM	Perméation (Sonication)
	HPM*	

HPM, BPM : Haut ou Bas Poids Moléculaire

* Précipite dans l'éthanol à froid

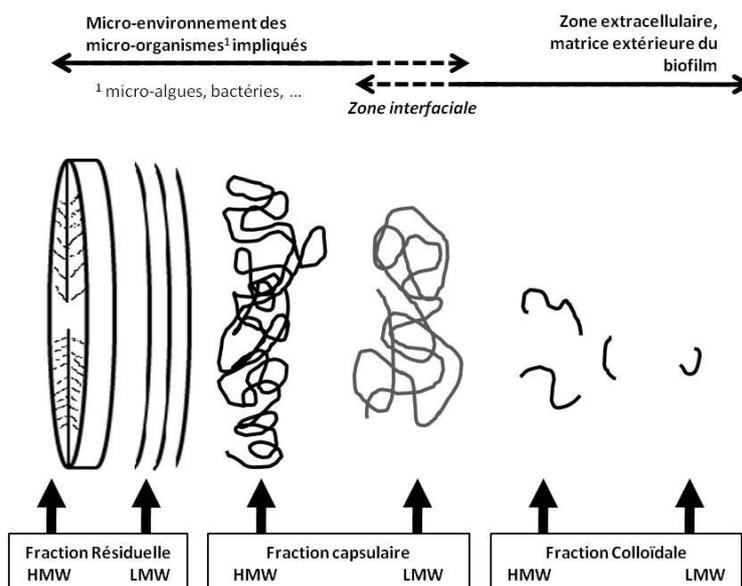


Figure II.1-3 : Adaptée à partir du modèle d'Underwood & Paterson (2003), hypothèse de localisation des différentes fractions de SPE récoltées par la méthode d'extraction de Takahashi et al. (2009).

Matériel et réactifs : résine Dowex Marathon C, 20-50 mesh, Na⁺ (Sigma-Aldrich 91973). Ethanol absolu (Carlo Erba 524125). Chlorure de sodium (Sigma-Aldrich S7653). Chlorure de potassium (Sigma-Aldrich P9333). Sulfate de magnésium heptahydraté (Sigma-Aldrich 63138). Chlorure de calcium dihydraté (Sigma-Aldrich 223506). Chlorure de calcium (Sigma-Aldrich C2661). Di-hydrogénophosphate de potassium (Sigma-Aldrich P5655). Di-sodium hydrogénophosphate dodécahydraté (Sigma-Aldrich 71649). Eau de mer artificielle 10X (EMA 10X, 234g NaCl ; 15g KCl ; 12g MgSO₄, 7 H₂O ; 1,5g CaCl₂, 2 H₂O ; 1,5g CaCl₂ ; eau ultra-pure qsp 1L). EMA 1X (30 practical salinity units). Tampon phosphate salin TPS pH 7,2 (8g NaCl ; 0,2g KH₂PO₄ ; 2,88g Na₂HPO₄, 12 H₂O ; 0,2g KCl ; eau ultra-pure qsp 1L). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons frais de sédiments. Rotator SB2 à vitesse fixe 20 rpm (Stuart, France). Sonicateur Bioblock 72442 Vibra Cell (Fisher Scientific, France).

Mode opératoire : les extractions sont réalisées immédiatement après prélèvement sur le terrain. Mélanger 20 mL de sédiment frais à 20 mL d'EMA (30psu) durant une heure à 4°C dans l'obscurité sous agitation (20 rpm). Centrifuger à 3500 g pendant 10 min à 4°C. Stocker le surnageant (a) contenant les SPE colloïdales à 4°C. 20 mL d'EMA et 1 g d'une résine cationique¹ activée sont ajoutés au culot (b). Agiter doucement les échantillons à 4°C durant 1 h à l'obscurité, puis centrifuger à 3500 g durant 10 min à 4°C. Stocker le surnageant contenant les SPE capsulaires (c) à 4°C et congeler le culot contenant des polymères intracellulaires et résiduels (d) à -20°C. Les polymères résiduels et intracellulaires sont ensuite extraits (e) à partir des échantillons congelés (d) par sonication (100 W pendant 3min dans la glace) après resuspension dans 20 mL d'EMA.

Pour chacune des fractions (a), (c) et (e), ajouter de l'éthanol absolu à froid (-20°C) afin d'obtenir une concentration finale en éthanol de 75 % (v/v). Mélanger doucement les solutions puis les stocker une nuit à -20°C. Le lendemain, centrifuger les solutions à 3500 g pendant 15 min à 4°C afin d'obtenir un surnageant (fraction de Bas Poids Moléculaire, BPM) et un culot (fraction de Haut Poids Moléculaire, HPM). Enfin, sécher les fractions sous flux d'air sec et stocker à -20°C.

¹ La résine Dowex est considérée comme activée après 1h à l'obscurité dans du TPS à pH 7,2.

II.1.3 Analyses biochimiques de SPE par spectrophotométrie

La première partie de cette étude a consisté en la détermination de la composition biochimique des différentes fractions de SPE extraites. Pour se faire, les teneurs en sucres totaux, sucres réducteurs, acides uroniques, protéines et sulfates ont été quantifiées au moyen de méthodes colorimétriques. Notons que les concentrations relatives en sucres totaux, neutres et acides uroniques ont été déterminées par la méthode de correction développée par Montreuil *et al.* (1963), qui permet d'éliminer les interférences dues aux sucres neutres notamment dans le dosage des acides uroniques.

Tableau II.1-2 : Seuils minimaux de détection des différentes méthodes colorimétriques utilisées au cours de l'étude.

Dosage colorimétrique	Méthode utilisée	Seuil minimal de détection (mg/L)
Sucres totaux	<i>cf. II.1.3.1</i>	15
Acides uroniques	<i>cf. II.1.3.2</i>	20
Sulfates	<i>cf. II.1.3.3</i>	0,5
Protéines	<i>cf. II.1.3.4</i>	5
Sucres réducteurs	<i>cf. II.1.4.3.2</i>	200

II.1.3.1 Dosage des sucres totaux

La composition en sucres totaux des différentes fractions de SPE a été déterminée via l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Dubois *et al.* (1956). Il est important de noter que les acides uroniques peuvent être également détectés par cette méthode.

Principe : sous l'action d'acides minéraux concentrés et à chaud, les hexoses et pentoses du milieu subissent une déshydratation interne poussée, suivie d'une cyclisation aboutissant à la formation de dérivés du furfural et 5-hydroxyméthylfurfural, réagissant avec le phénol. La formation d'un complexe jaune-rouge permet de suivre la concentration en sucres totaux de l'échantillon en lisant l'absorbance à 485 nm.

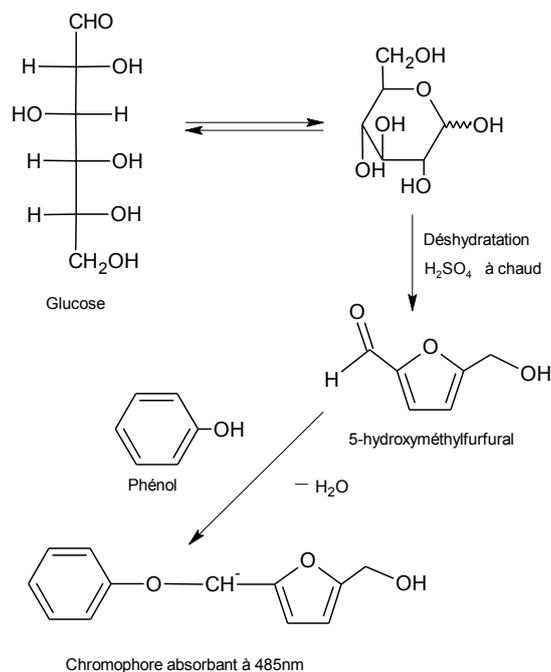


Figure II.1-4 : Principe du dosage colorimétrique des sucres totaux par la méthode de Dubois et al. (1956).

Matériel et réactifs : phénol (Sigma-Aldrich P3653). Acide sulfurique 95-98 % (Sigma-Aldrich 320501). Solution aqueuse de phénol à 5 % (m/v). Glucose (Sigma-Aldrich G8270). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à analyser (10 à 50 g/L selon l'analyse, avec dilutions si nécessaire).

Mode opératoire : dans chaque tube à essai, introduire 1mL de la solution à doser. Placer le tube dans la glace, puis ajouter 1mL de la solution aqueuse de phénol à 5 %. Ajouter avec précaution 5 mL d'acide sulfurique 95-98 % puis agiter. Laisser le milieu évoluer pendant 30 min à l'obscurité. Lire la DO à $\lambda=485$ nm.

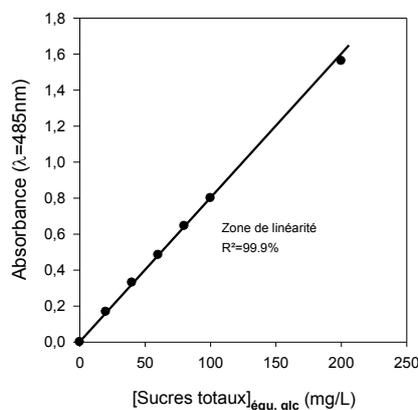


Figure II.1-5 : Gamme d'étalonnage du glucose et zone de linéarité de la méthode de Dubois et al. (1956).

II.1.3.2 Dosage des acides uroniques

La composition en acides uroniques des différentes fractions de SPE a été déterminée grâce à l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973) modifiée par Filisetti-Cozzy *et al.* (1991).

Principe : sous l'action d'acides minéraux concentrés à chaud, les acides uroniques du milieu subissent une déshydratation interne poussée suivie d'une cyclisation aboutissant à la formation de dérivés d'acide 5-formylfuroïque. Les acides uroniques réagissent alors avec le *mé*ta-hydroxydiphényle (MHDP) pour former un chromophore de couleur rose absorbant à $\lambda=525$ nm. La coloration est améliorée par la présence de borate mais reste très sensible aux interférences dues aux oses neutres qui se déshydratent et colorent en présence d'acide sulfurique concentré. L'ajout de sulfamate de potassium permet de limiter ces interférences.

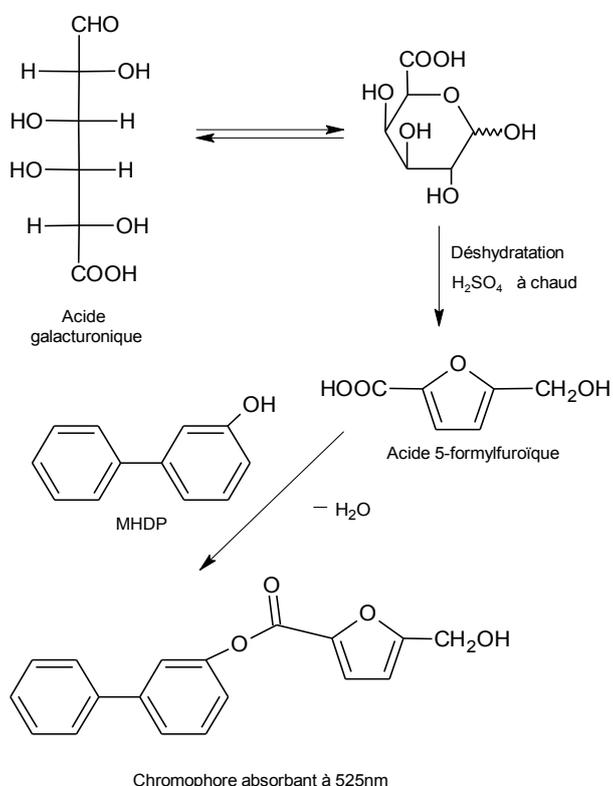


Figure II.1-6 : Principe du dosage colorimétrique des acides uroniques par la méthode de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973).

Matériel et réactifs : tetraborate de sodium (Sigma-Aldrich 221732). Acide sulfurique 95-98 % (Sigma-Aldrich 320501). Acide sulfamique (Sigma-Aldrich 383120). *mé*ta-hydroxydiphenyl (MHDP) (Sigma-Aldrich 26225). Hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich 71691). Solution de tetraborate de sodium à 0,075 M dans de l'acide sulfurique à 95-98 %. Solution aqueuse d'acide sulfamique à 4 M, pH 1,6. Solution aqueuse de *mé*ta-hydroxydiphenyl (MHDP) à 0,15 % dans de l'hydroxyde de sodium 0,5 %. Acide galacturonique (Sigma-Aldrich 48280). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à analyser (10 à 50 g/L selon l'analyse, avec dilutions si nécessaire).

Mode opératoire : dans des tubes à essai placés préalablement dans de la glace, ajouter 400 μ L de la solution à doser. Ajouter 40 μ L de la solution d'acide sulfamique 4 M puis agiter. Ajouter 2,4 mL de la solution de tetraborate de sodium à 0,075 M avec précaution puis agiter. Placer 20 min à 80°C. Refroidir les tubes 5min dans la glace. Ajouter 80 μ L de la solution aqueuse de MHDP 0,15 % et agiter fortement. Laisser évoluer pendant 10min puis lire la DO à $\lambda=525$ nm.

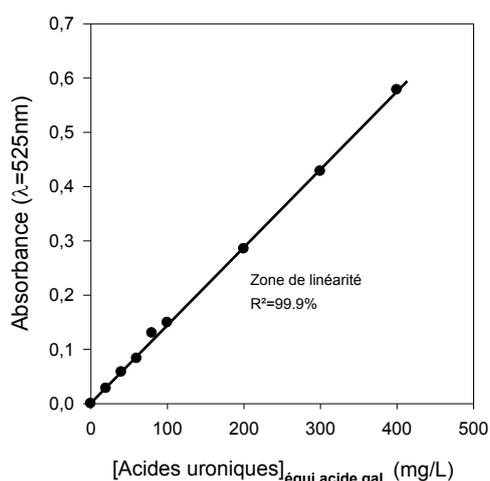


Figure II.1-7 : Gamme d'étalonnage de l'acide galacturonique et zone de linéarité de la méthode de Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973).

II.1.3.3 Dosage des groupements sulfates

La quantité de sulfates présente dans les différentes fractions de SPE analysées a été déterminée par l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Jaques *et al.* (1968).

Principe : en phase aqueuse, le 3-amino-7-(diméthylamino)phénouthizin-5-ium chloride (Azure A) va complexer, les sulfates pouvant être présents, notamment au sein des polysaccharides composant les fractions de SPE. Le milieu va développer une couleur rose-violet absorbant à $\lambda=535$ nm, due à la formation d'un chromophore en présence de sulfates. Le dosage est semi-quantitatif et donne un ordre de grandeur (\sim mg) de la concentration en sulfates d'un échantillon.

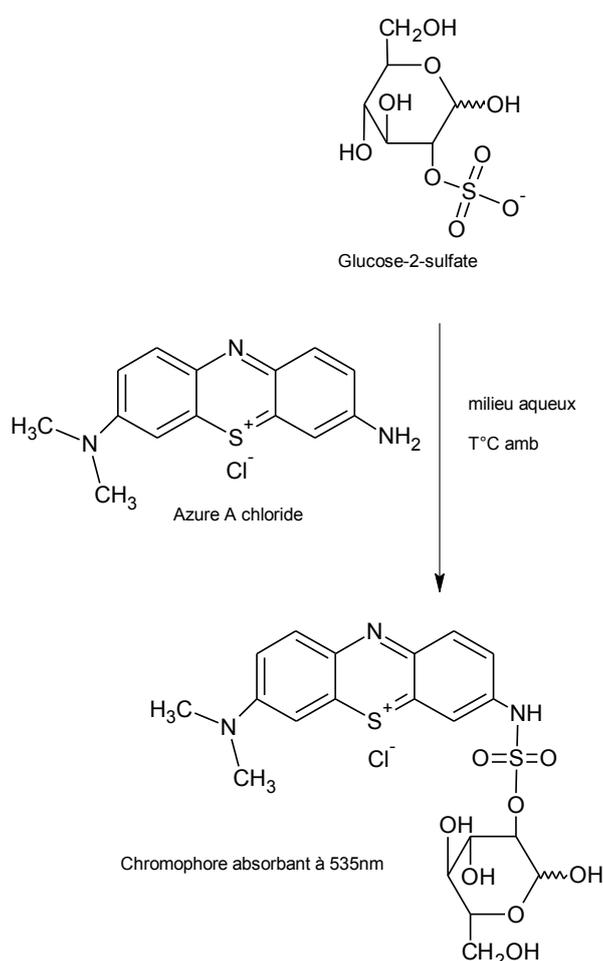


Figure II.1-8 : Principe du dosage colorimétrique des sulfates par la méthode de Jaques et al. (1968).

Matériel et Réactifs : azure A (Sigma-Aldrich A6270). Solution aqueuse d'Azure A à 10 mg/L. Sulfate de dextrane (SD), composé sulfaté à 17 % (Sigma-Aldrich D6001). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à analyser (10 à 50 g/L selon l'analyse, avec dilutions si nécessaire).

Mode opératoire : dans des cuves en plastique pour spectrophotomètre, introduire 200 μL de solution à doser. Ajouter 2 mL de solution aqueuse d'Azure A à 10 mg/L puis agiter. Lire la DO à $\lambda=535$ nm. La quantification des sulfates est déterminée à partir de la gamme d'étalonnage du SD et correction du degré de sulfatation de ce dernier (17 mg de sulfates pour 100 mg de SD).

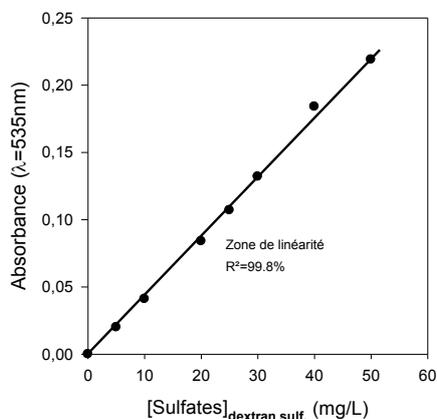


Figure II.1-9 : Gamme d'étalonnage du sulfate de dextrane et zone de linéarité de la méthode de Jaques *et al.* (1968).

II.1.3.4 Dosage des protéines

La quantité de protéines présentes dans les différentes fractions de SPE analysées a été déterminée via l'utilisation de la méthode de dosage colorimétrique développée par Smith *et al.* (1985).

Principe : à 60°C en milieu alcalin (pH 11), certains acides aminés facilement oxydables et/ou les liaisons peptidiques des protéines vont permettre la réduction des ions cuivriques Cu^{2+} en ions cuivreux Cu^{1+} . Les ions cuivreux vont alors être chélatés par le 4,4'-dicarboxy-2,2'-biquinoline (acide bicinchoninique, BCA) pour former un chromophore absorbant à $\lambda=562$ nm. L'intensité de la réduction est quantifiable et permet de déterminer indirectement et de manière proportionnelle la quantité de protéines présentes.

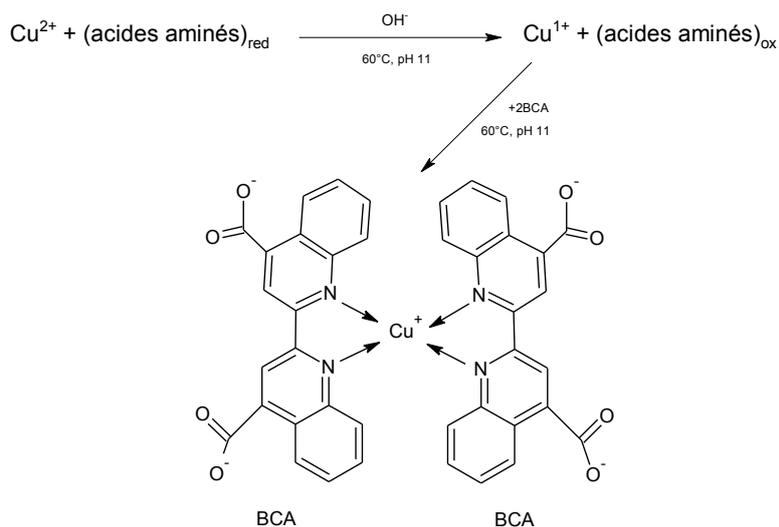


Figure II.1-10 : Principe du dosage colorimétrique des protéines par la méthode de Smith et al. (1985).

Matériel et réactifs : kit BCA pour l'analyse des protéines (Sigma-Aldrich BCA1). Albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich P0914). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à analyser (10 à 100 g/L selon l'analyse, avec dilutions si nécessaire).

Mode opératoire : préparer la quantité nécessaire de réactif de travail (Tableau II.1-3). Dans des tubes Falcon, ajouter 2 mL de réactif BCA puis 0,1 mL de la solution à doser. Agiter doucement. Placer dans un bain marie à 60°C pendant 15 min exactement puis laisser les tubes refroidir quelques minutes à température ambiante. Lire la DO du mélange à $\lambda=562$ nm.

Tableau II.1-3 : Méthode de préparation du réactif de travail pour le dosage des protéines selon la méthode de Smith et al. (1985).

Nombre d'essais	Réactif A (BCA)	Réactif B (solution Cu^{2+})	Volume total de réactif de travail
4	8	0,16	8,16
8	16	0,32	16,32
9	19	0,38	19,38
12	25	0,5	25,5

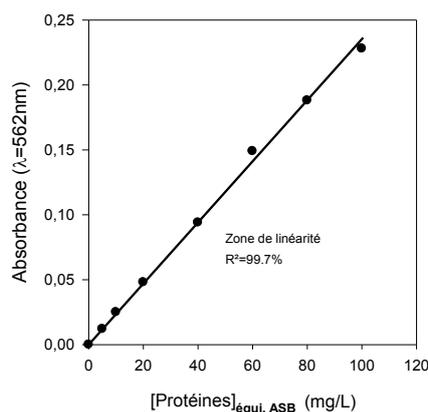


Figure II.1-11 : Gamme d'étalonnage de l'albumine de sérum bovin et zone de linéarité de la méthode de Smith et al. (1985).

II.1.4 Composition osidique : identification et quantification

Un certain nombre de prétraitements ont été nécessaires afin de purifier les polysaccharides présents dans les échantillons analysés et rendre leurs analyses possible par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) et Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) couplée à de la Spectrométrie de Masse (SM). Dans un premier temps, les polysaccharides extraits de la macro-algue *Chaetomorpha aerea* (cf. II.1.2.1, p. 114) ainsi que des algues microphytobenthiques (cf. II.1.2.2, p. 117) ont été purifiés par dialyse. Puis, les polysaccharides ont été hydrolysés (rupture des liaisons glycosidiques) afin de permettre la libération partielle ou complète des monomères constitutifs tout en les préservant d'éventuelles dégradations secondaires. Enfin, les monomères obtenus ont été directement analysés par CLHP ou préalablement dérivés puis analysés par CPG/SM.

II.1.4.1 Purification des polysaccharides par dialyse

Principe : la dialyse, basée sur la séparation de différents composants d'un même échantillon, permet la diffusion sélective et la purification de molécules en fonction de la porosité de la membrane utilisée. Cette porosité détermine le poids moléculaire des molécules pouvant ou non la traverser. Pour la purification des polysaccharides présents dans les fractions de SPE analysées, un seuil de coupure de 6-8 kDa a été choisi (Bellinger *et al.* 2005).

Matériel et réactifs : Membranes à dialyse Spectra/Por, seuil de coupure 6-8 kDa (VWR 734-0663). Eau ultra pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à analyser (10 à 100 g/L selon l'analyse et la solubilité du produit). Lyophilisateur (HETO LyoPro 3000, France).

Mode opératoire : Préparer la solution de SPE à analyser dans de l'eau ultra pure à des concentrations comprises entre 10 g/L et 100 g/L. 5 mL sont prélevés et placés dans une membrane à dialyse (seuil de coupure 6000-8000 Da). Fermer la membrane et la placer dans un erlenmeyer contenant 500 mL d'eau ultra-pure. Placer le système sous agitation à 4°C dans le noir durant 48 h. Récupérer la fraction interne enrichie en polysaccharides. Récupérer la fraction externe riche en sels. Lyophiliser les deux fractions.

II.1.4.2 Dépolymérisation des polysaccharides

Afin de dépolymériser les polysaccharides purifiés, des hydrolyses acides ménagées ou totales ont été réalisées. L'obtention d'oligosaccharides, sous forme de monomères va permettre l'analyse des sucres par CLHP ou CPG/SM.

Principe : en se basant sur la stabilité différentielle des liaisons glycosidiques (1, 6' > 1, 4' > 1, 3' > 1, 2') et les travaux de Bemiller (1967), une hydrolyse acide plus ou moins modérée (température, temps de réaction, type, concentration et force de l'acide) permet de libérer des fragments saccharidiques de masses molaires variables. Le mécanisme général de ce type d'hydrolyse acide est décrit Figure II.1-12. En outre, la nature des unités saccharidiques liées présente également des différences de stabilité et ce pour une même liaison glycosidique. Ainsi, une liaison (1,4') glycosidique entre une unité osidique et une autre unité portant un groupement carboxylique ou amine sera plus difficile à rompre qu'une liaison du même type entre un ose et un autre (sous forme furanose, anhydro- ou désoxy-). Dans ce sens, les travaux de Timell *et al.* (1965) ont mis en évidence la stabilité de la liaison uronosidyle (Figure II.1-13).

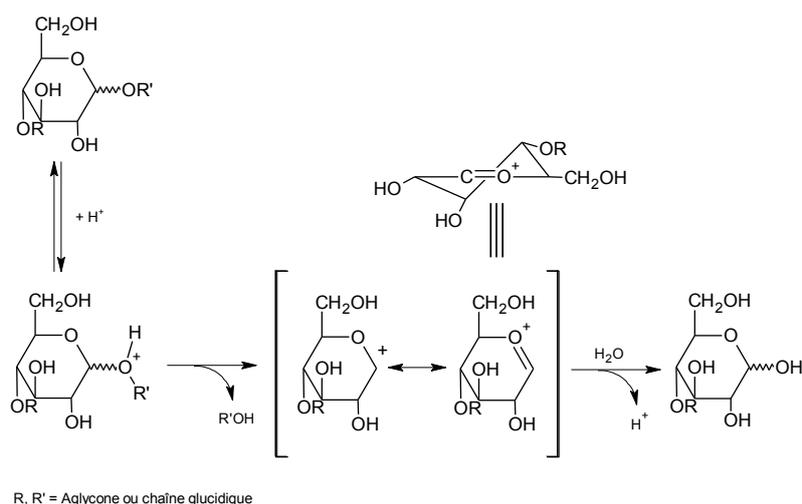


Figure II.1-12 : Mécanisme général de l'hydrolyse acide des glycosides d'après Bemiller (1967).

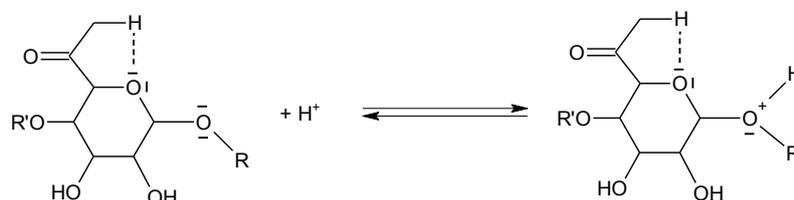


Figure II.1-13 : Stabilité de la liaison uronosidyle à l'hydrolyse acide d'après Timell et al. (1965).

Matériel et réactifs : acide chlorhydrique (Fisher Scientific W0359R). Solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 2M. Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à hydrolyser : polysaccharides purifiés après dialyse (*cf. II.1.4.1, p. 126*) de 10 g/L à 100 g/L avec dilutions si nécessaire. Lyophilisateur (HETO LyoPro 3000, France).

Mode opératoire : préparer une solution aqueuse enrichie en polysaccharides en milieu acide HCl 2 M (10 à 100 g/L). Porter le mélange à 90°C pendant un temps défini, fonction du degré de dépolymérisation souhaité (4 h pour une dépolymérisation totale). Lyophiliser.

II.1.4.3 Degré de dépolymérisation : hydrolyse ménagée ou hydrolyse totale

II.1.4.3.1 Suivi par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Technique de chromatographie planaire, la Chromatographie sur Couche Mince a été utilisée pour suivre le degré de dépolymérisation des différents échantillons saccharidiques.

Principe : un éluant relativement polaire entraîne la solution saccharidique lors de sa migration capillaire le long de la phase stationnaire silicée. Les sucres sont ensuite révélés par chauffage de la plaque CCM après l'addition préalable sous forme de spray d'une solution d'orcinol sulfurique diluée. Sous l'action de l'acide sulfurique et du traitement thermique, des dérivés du furfural et 5-hydroxyméthylfurfural vont se former, réagissant avec l'orcinol (*cf. II.1.3.1, p. 119*). La formation d'un complexe jaune-rouge permet de mettre en évidence des spots de couleur plus ou moins intense en fonction de la concentration du sucre. La distance de migration des molécules déposées (d), fonction de leurs affinités pour les différentes phases, est mesurée. La mesure de la distance de migration de l'éluant (d_s) permet la détermination d'un rapport frontal (R_f) spécifique à chaque monosaccharide ou polysaccharide analysé.

$$\text{Équation II.1-1} \quad R_f = \frac{d}{d_s}$$

Matériel et réactifs : butanol (Carlo Erba 414131). Acide acétique (Sigma-Aldrich 242853). Orcinol (Sigma-Aldrich 447420). Acide sulfurique (Sigma-Aldrich 320501). Eluant [Butanol/Acide acétique/Eau ultra-pure (2/1/1) (v/v/v)]. Révélateur [Solution d'orcinol sulfurique 1 %, 1 g orcinol dans 100 mL d'H₂SO₄ à 20 %]. Standards saccharidiques (Sigma-Aldrich) suspendus en solution aqueuse à hauteur de 1 g/L : glucose (G8270), galactose (G0750), acide glucuronique (G5269), acide galacturonique (48280), mannose (63580), arabinose (A3256), fucose (F8150), xylose (X1075), fructose (F0127), rhamnose (R3875), lactose (61345), raffinose (R0250), dextrane (D9260), sulfate de dextrane (D6001), fucoïdane (47865). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Plaque CCM (Sigma-Aldrich 60778). Décapeur thermique (Sigma-Aldrich Z653357). Échantillons partiellement ou totalement dépolymérisés, suspendus dans de l'eau ultra-pure (10, 25 ou 50 g/L selon l'analyse).

Mode opératoire : préparer les solutions standards à 1 g/L dans de l'eau ultra-pure. Pour chaque standard et échantillon, déposer 2 μL puis sécher le dépôt et déposer à nouveau 2 μL . Placer la plaque CCM dans une cuve saturée par l'éluant Butanol/Acide acétique/Eau ultra-pure (2/1/1) (v/v/v) et laisser migrer 5 h. Récupérer la plaque après élution. Mesurer la distance de migration de l'éluant. Laisser sécher 30 min puis révéler à l'aide d'une solution d'orcinol sulfurique 1 % sous forme de spray. Laisser sécher 15 min puis chauffer la plaque de silice à l'aide d'un décapeur thermique jusqu'à apparition des tâches. Mesurer la distance de migration de chaque spot. Déterminer les rapports frontaux des standards et des échantillons inconnus.

II.1.4.3.2 Suivi par dosage au 3,5-DiNitroSalicylate (DNS)

Principe : en milieu alcalin et à chaud, le 3,5-dinitrosalicylate (chromophore jaune) est réduit en 3-amino-5-nitrosalicylate (chromophore rouge orangé) par les glucides réducteurs présents dans la solution analysée.

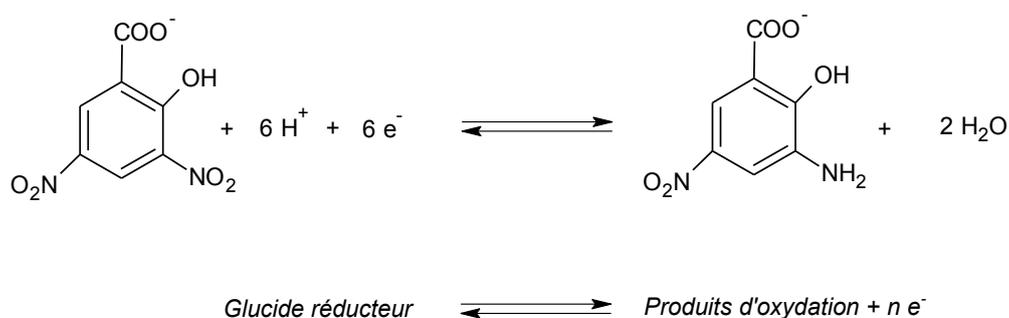


Figure II.1-14 : Réduction du 3,5-dinitrosalicylate au cours d'un traitement alcalin à chaud par des glucides réducteurs.

Matériel et réactifs : acide 3,5-dinitrosalicylique (Sigma-Aldrich 128848). Tartrate de sodium et potassium (Sigma-Aldrich 217255). Hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich 71691). Acide chlorhydrique (Fisher Scientific W0359R). Solution aqueuse d'HCl à 1 M. Solution aqueuse de NaOH à 2 M. Réactif DNS à 10g/L (3,5-DNS 10 g/L (m/v), COOK(CHOH)₂COONa 300 g/L (m/v), NaOH 2M 200mL, H₂O qsp 1 L. Glucose (Sigma-Aldrich G8270). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons partiellement ou totalement dépolymérisés suspendus dans de l'eau ultra-pure (10, 25 ou 50 g/L selon l'analyse).

Mode opératoire : à partir d'un hydrolysats acide préparé selon le protocole décrit en partie II.1.4.2, neutraliser 100 μ L par l'ajout de 100 μ L de NaOH à 2 M. Ajouter 200 μ L du réactif DNS puis agiter. Porter le mélange 10 min à 100°C. Refroidir puis ajouter 2000 μ L d'eau ultra-pure. Lire la DO du mélange à $\lambda=550$ nm.

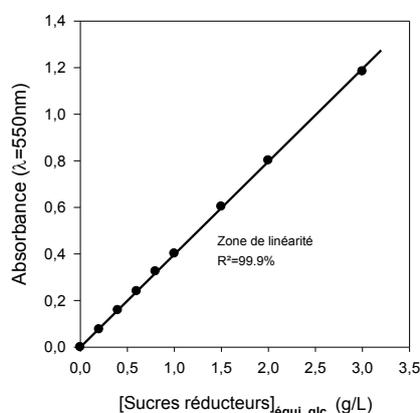


Figure II.1-15 : Gamme d'étalonnage du glucose et zone de linéarité de la méthode au 3,5-DNS.

II.1.4.4 Analyse des polysaccharides par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La technique est couramment employée pour l'identification de composés purs ou même pour déterminer la composition d'un mélange complexe.

Principe : méthode physique d'analyse chimique, la spectrométrie infrarouge se base sur le mode de vibration d'une molécule et des liaisons chimiques qui la composent dans l'infrarouge. C'est une technique de choix pour l'analyse biologique car elle donne une image complète et globale de l'échantillon dans un temps limité (Keirsse 2003).

Matériel et réactifs : albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich A9647). Fucoïdane (Sigma-Aldrich 47865). Acide glucuronique (Sigma-Aldrich G5269). Glucose (Sigma-Aldrich G7528). Dextrane (Sigma-Aldrich D9260). Sulfate de dextrane (Sigma-Aldrich D6001). Fucogel 1000PP (Solabia, France). Polysaccharides inconnus purifiés. Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Spectrum 100 FTIR, Perkin Elmer, France) équipé d'un module à Réflexion Totale Atténuée (ATR) et d'un cristal en diamant. L'analyse des résultats est réalisée via l'utilisation du logiciel Spectrum (version 6.1.0).

Mode opératoire : des analyses par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier sont réalisées pour chaque standard et polysaccharide inconnu en déposant quelques mg d'échantillons dans l'appareil. La résolution spectrale est de 4 cm^{-1} et 20 scans sont mesurés et moyennés pour chaque échantillon testé. Les aires des bandes d'absorption les plus importantes sont déterminées par intégration après soustraction du bruit de fond, correction de la ligne de base et affinement du spectre.

II.1.4.5 Analyse des résidus glycosidiques par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

II.1.4.5.1 Chromatographie Liquide Haute Performance par exclusion stérique

Avant et après libération des résidus glycosidiques par dépolymérisation, les glucides présents sont analysés en CLHP par exclusion stérique.

Principe : la chromatographie d'exclusion stérique, ou gel filtration, permet de séparer les composés d'un mélange en fonction de leurs volumes hydrodynamiques. Les conditions expérimentales utilisées permettent de minimiser les mécanismes enthalpiques d'affinité au profit des mécanismes entropiques d'exclusion stérique. Suivant leur taille, les molécules éluées pénètrent plus ou moins facilement les pores du polymère constituant la phase stationnaire de la colonne de gel filtration. Les molécules, dont les volumes hydrodynamiques sont supérieurs à celui des pores du polymère, seront éluées beaucoup plus rapidement que des molécules de plus petites tailles. La détermination de la masse moléculaire M_x d'une molécule passe par le calcul du coefficient de partition K_D :

$$\text{Équation II.1-2} \quad K_D = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

où V_e est le volume d'éluion de la molécule étudiée, V_0 est le volume d'exclusion du gel défini par le volume d'éluion d'une molécule non retardée et V_t le volume poreux total du gel obtenu à partir du volume d'éluion d'une molécule totalement retardée.

L'analyse est effectuée par réfractométrie différentielle. De manière pratique, l'utilisation de standards de masse molaire connue permet la détermination d'une équation logarithmique étalon (Équation II.1-3) à partir de laquelle il est possible d'obtenir la masse moléculaire M_x de la molécule étudiée.

$$\text{Équation II.1-3} \quad \log_{10}(M_x) = -a \ln(t_r) + b$$

où M_x est la masse moléculaire de la molécule étudiée, a et b sont respectivement le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage et t_r est le temps de rétention de la molécule étudiée.

Tableau II.1-4 : Masse moléculaire (Da) de standards glucidiques couramment utilisés en gel filtration.

Standards	Masse moléculaire (Da)
Bleu de dextrane	$2,00.10^6$
Sulfate de dextrane	$5,00.10^5$
Dextrane	$1,10.10^4$
Raffinose	$5,04.10^2$
Lactose	$3,42.10^2$
Glucose	$1,80.10^2$

Matériel et réactifs : membrane de filtration 0,22 μm (Millipore GPWP04700). Standards glucidiques (Sigma-Aldrich) suspendus en solution aqueuse à hauteur de 1 g/L : bleu de dextrane (D4772), sulfate de dextrane (D6001), dextrane (D9260), raffinose (R0250), lactose (61345), glucose (G8270). Eau ultra-pure filtrée (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons filtrés à analyser (10, 25 ou 50 g/L selon l'analyse).

Colonne TSK-GEL G3000 PWXL-CP (Interchim, France). Chaîne CLHP Hewlett Packard series 1100 équipée des modules suivants : G1322A Degasser, G1311A QuatPump, G1315A DAD (lampes UV-Visible), G1316A Chauffe Colonne, Injecteur/Passeur HP Series 1050, Waters 410 Differential Refractometer Millipore.

Mode opératoire : suspendre l'échantillon dans de l'eau-ultra pure (10, 20, 50 g/L selon les analyses) puis filtrer sur 0,22 μm . Analyser l'échantillon par CLHP sur une colonne TSK-GEL G3000 PWXL-CP selon les conditions suivantes :

(i) débit : 0,7 mL/min ; (ii) température de colonne : 40°C ; (iii) mode de détection : réfractométrie différentielle ; (iv) quantité injectée : 20 μL ; (v) standards : bleu de dextrane, sulfate de dextrane, dextrane, raffinose, lactose, glucose ; (vi) étalonnage : externe. L'analyse des résultats et la quantification sont réalisées via l'utilisation du logiciel d'analyse HP ChemStation for LC 3D.

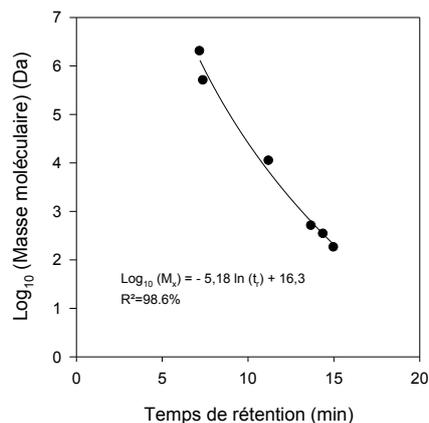


Figure II.1-16 : Gamme d'étalonnage de différents polysaccharides par gel filtration. Colonne TSK-GEL G3000 PWWL-CP, conditions d'analyse II.1.4.5.1.

II.1.4.5.2 Chromatographie Liquide Haute Performance par exclusion ionique

Après libération des résidus glycosidiques par dépolymérisation, les monosaccharides sont analysés en CHLP par exclusion ionique.

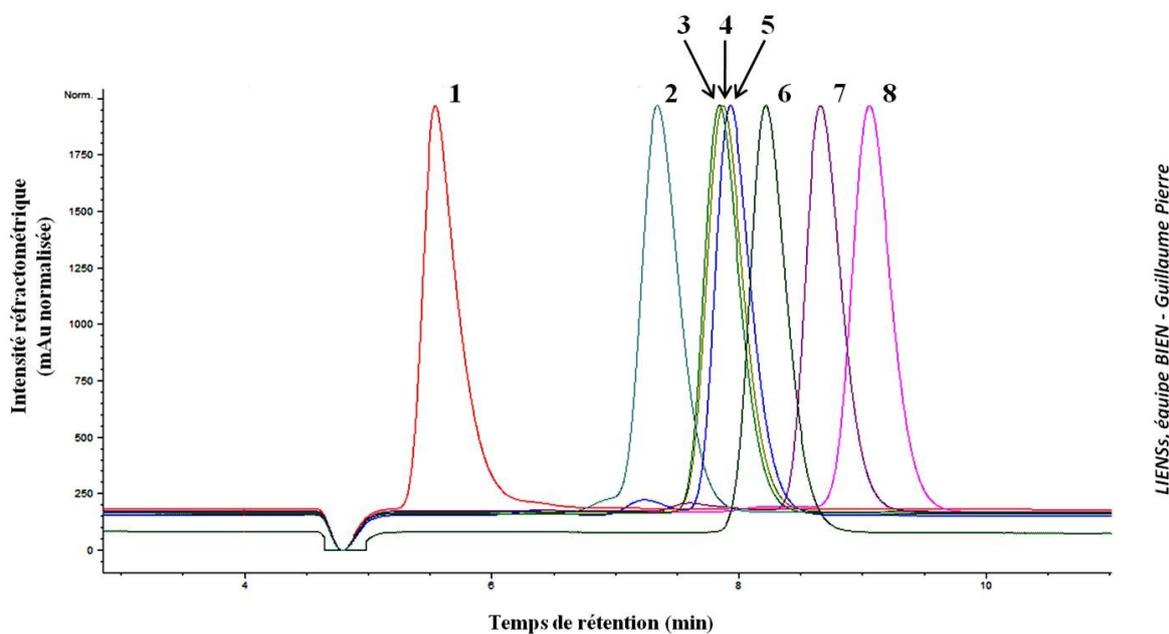
Principe : en se basant sur les principes d'exclusion stérique et des phénomènes inhérents d'adsorption, la résolution des monosaccharides est réalisée par l'utilisation d'une colonne d'exclusion ionique. La composition de la phase mobile subit ainsi l'influence des charges électriques portées par la colonne chromatographique utilisée, générant des phénomènes de rétention et de répulsion. L'analyse est effectuée par réfractométrie différentielle.

Matériel et Réactifs : membrane de filtration 0,22 μm (Millipore GPWP04700). Acide sulfurique à 95-98 % (Sigma-Aldrich 320501). Solution aqueuse d'acide sulfurique 0.01M filtrée. Standards saccharidiques (Sigma-Aldrich) suspendus en solution aqueuse à hauteur de 10 g/L : glucose (G8270), galactose (G0750), acide glucuronique (G5269), acide galacturonique (48280), mannose (63580), arabinose (A3256), fucose (F8150), xylose (X1075), fructose (F0127), rhamnose (R3875), raffinose (R0250), *myo*-inositol (I5125). Eau ultra-pure filtrée (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons filtrés à analyser (10, 25 ou 50 g/L selon l'analyse).

Colonne ICsep ORH-801 (Interchim, France). Chaîne CLHP Hewlett Packard series 1100 équipée des modules suivants : G1322A Degasser, G1311A QuatPump, G1315A DAD (lampes UV-Visible), G1316A Chauffe Colonne, Injecteur/Passer HP Series 1050, Waters 410 Differential Refractometer Millipore.

Mode opératoire: suspendre l'échantillon dans de l'eau-ultra pure (10, 20, 50 g/L selon les analyses) puis filtrer sur 0,22 μm . Analyser l'échantillon par CLHP sur une colonne IC Sep ORH-801 selon les conditions :

(i) débit : 0,6mL/min ; (ii) température de colonne : température ambiante ; (iii) mode de détection : réfractométrie différentielle ; (iv) quantité injectée : 20 μL ; (v) standards (Figure II.1-16) : glucose⁽²⁾, galactose⁽⁵⁾, acide glucuronique, acide galacturonique, mannose⁽³⁾, arabinose⁽⁷⁾, fucose⁽⁸⁾, xylose⁽⁴⁾, fructose, rhamnose⁽⁶⁾, raffinose⁽¹⁾ ; (vi) étalonnage : interne. L'analyse des résultats et la quantification sont réalisées via l'utilisation du logiciel d'analyse HP ChemStation for LC 3D.



LIENSs, équipe BIEN - Guillaume Pierre

Figure II.1-17 : Spectre CLHP de quelques uns des sucres utilisés comme standards d'étalonnage. Colonne IC Sep ORH-801, conditions d'analyse II.1.4.5.2.

II.1.4.6 Analyse des résidus glycosidiques sous forme de dérivés triméthylsilylés par CPG/SM

Après libération des résidus glycosidiques par dépolymérisation, les monosaccharides sont dérivés en composés triméthylsilylés d'après la méthode de Kamerling *et al.* (1975) modifiée par Montreuil *et al.* (1986) afin de permettre leur analyse par Chromatographie en Phase Gaz (CPG) couplée à la Spectrométrie de Masse (SM).

Principe : technique d'analyse rapide et sensible, capable de séparer des mélanges complexes, la CPG/SM a été utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des monomères triméthylsilylés. Les échantillons analysés sont entraînés, après vaporisation, par un gaz vecteur (hélium) le long d'une colonne chromatographique légèrement polaire constituée de (14 %-Cyanopropyl-phenyl)-methylpolysiloxane. Après séparation des différents constituants en fonction de leur affinité pour la colonne, la détection est réalisée en SM par Impact Electronique (EI, 70 eV).

Les monomères constitutifs des polysaccharides obtenus par hydrolyse acide nécessite d'être triméthylsilylés pour permettre leur vaporisation. La triméthylsilylation est réalisée par réaction entre les glycosides et du *N,O*-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) 99% stabilisé par du triméthylchlorosilane (TMCS) 1 % en milieu fortement alcalin (pyridine). La méthode utilisée est adaptée de la triméthylsilylation de résidus *O*-méthylglycosides développée par Kamerling *et al.* (1975) (Figure II.1-18).

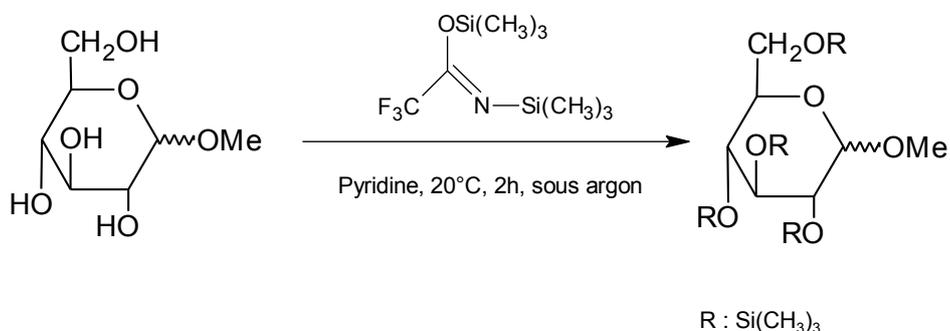


Figure II.1-18 : Méthode de triméthylsilylation des *O*-méthylglycosides d'après Kamerling *et al.* (1975).

L'analyse par CPG/SM permet d'identifier les monosaccharides constitutifs des fractions (contre des monosaccharides dérivés standards) et leurs proportions en fonction du coefficient de réponse propre à chaque résidu et de sa concentration. Toutefois, il est important de noter que l'équilibre mutarotationnel des formes furanose et pyranose des monomères peut être à l'origine de la formation de multiples dérivés pour un même monosaccharide.

Matériel et Réactifs : pyridine anhydre (Sigma-Aldrich 270970). *N,O*-bis-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide : triméthylchlorosilane (BSTFA : TMCS, réactif de Sylon) 99 : 1 (Sigma-Aldrich 33149). Dichlorométhane (Carlo Erba 463311). Standards saccharidiques (Sigma-Aldrich) : glucose (G8270), galactose (G0750), acide glucuronique (G5269), acide galacturonique (48280), mannose (63580), arabinose (A3256), fucose (F8150), xylose (X1075), fructose (F0127), rhamnose (R3875), *myo*-inositol (I5125). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Echantillons à analyser.

Colonne DB-1701 J&W Scientific Fisson (30 m, 0,32 mm de diamètre, 1 μ m d'épaisseur du film). Chromatographe Varian CP-3800 GC équipé d'un passeur automatique CP8400 Varian couplé à un spectromètre de masse Varian Saturn 2000.

Mode opératoire : à partir de 2 mg de polysaccharides dépolymérisés sous forme solide (lyophilisat des hydrolyses), ajouter 1 mg de *myo*-inositol. Ajouter 400 μ L de réactif de Sylon et 400 μ L de pyridine anhydre. Vortexer puis placer sous agitation à température ambiante pendant deux heures. Diluer par du dichlorométhane si besoin. Analyser l'échantillon par CPG/SM sur une colonne DB-1701 selon les conditions suivantes :

(i) pression du gaz vecteur (hélium) : 8,8 psi, (ii) débit colonne : 1mL/min, (iii) rapport de split : 20, (iv) quantité injectée : 0,1 à 5 μ L, (v) température de l'injecteur : 150°C, (vi) programme de montée en température du four : pallier initial à 150°C puis montée en température de 10°C/min jusqu'à 200°C, puis pallier à 200°C pendant 35 min, (vii) ionisation : Impact Electronique (EI, 70 eV), (viii) température de la trappe : 150°C, (ix) ions ciblés : plage de masse 40-650 m/z, (x) standards triméthylsilylés : glucose, galactose, acide glucuronique, acide galacturonique, mannose, arabinose, fucose, xylose, fructose, rhamnose, (xi) étalonnage : externe et interne (*myo*-inositol). L'analyse des résultats et la quantification sont réalisées via l'utilisation du logiciel d'analyse Varian MS Workstation 6.9.1.

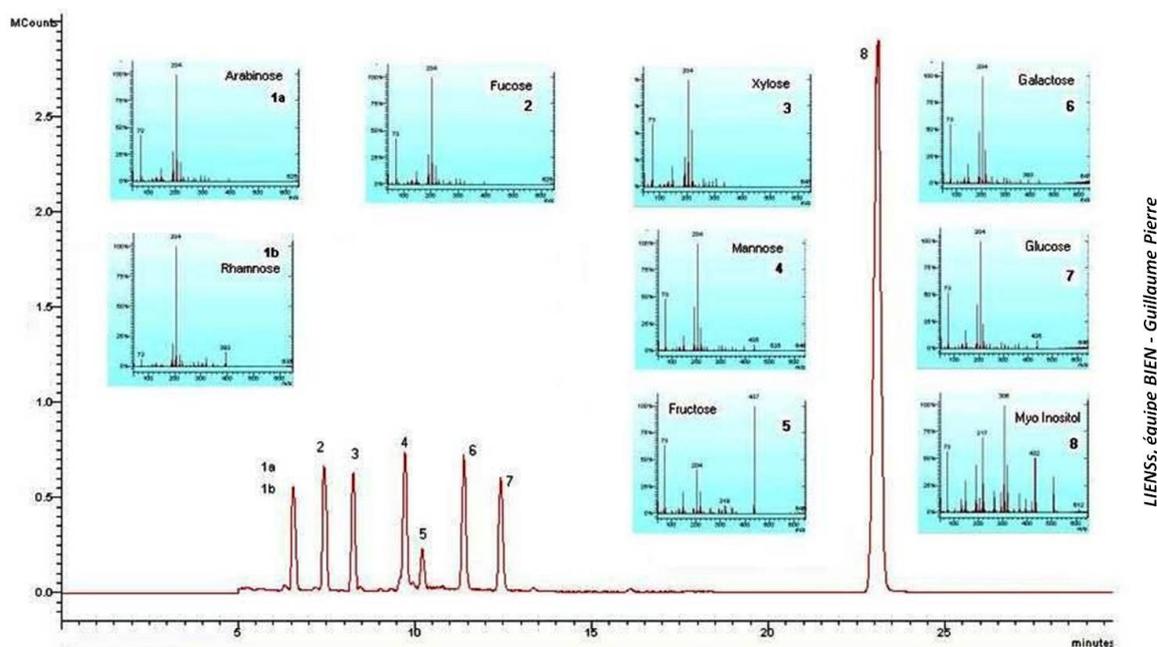


Figure II.1-19 : Spectre GC/MS des sucres neutres dérivés, utilisés comme standards d'étalonnage. EI 70eV, 40-650m/z, colonne DB-1701, conditions d'analyse II.1.4.6.

II.1.5 Propriétés antimicrobiennes

Différents tests microbiologiques ont été réalisés afin de mettre en évidence de possibles activités antimicrobiennes chez certains des extraits testés.

II.1.5.1 Antibiogrammes : activité antibactérienne

L'activité antibactérienne d'extraits a été étudiée par des antibiogrammes, techniques de diffusion radiale d'échantillons en milieux gélifiés.

Principe : les bactéries en culture sont mises en présence d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus. Les conséquences de la présence d'une molécule active sur le développement bactérien sont directement observables via la formation d'halos d'inhibition autour du dépôt de l'échantillon testé. Ces halos indiquent la présence de molécules actives dans l'extrait étudié, parfois grâce à la présence d'une molécule antibiotique. Un antibiotique est une substance organique ayant pour action spécifique de détruire (activité bactéricide^(*)) ou fortement inhiber la croissance de micro-organismes (activité bactériostatique^(**)).

Ces molécules sont soit d'origine naturelle (spécifiquement élaborées par des micro-organismes ou présentes dans des organismes végétaux), soit synthétisées ou hémisynthétisées (la majorité des antibiotiques actuels). A faible dose¹, elles sont dépourvues de toxicité pour d'autres cellules et présentent différents mécanismes d'action : (i) sur la paroi bactérienne, (ii) sur la membrane des cellules, (iii) sur la synthèse protéique, (iv) sur la synthèse des acides nucléiques.

Matériel et réactifs : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (CIP 103214). Agar bactériologique type E (Biokar Diagnostics A1012HA). Bouillon Muller Hinton (MH) (Difco 275730). Milieu gélosé Muller Hinton 12 ‰ (agar, m/v). Milieu Trypto-caséine soja (TSB) (Biokar Diagnostics BK046HA). Milieu gélosé Trypto-caséine soja 6 ‰ (agar, m/v). Milieu gélosé Trypto-caséine soja 12 ‰ (agar, m/v). Bouillon Nutritif (Biokar Diagnostics BK003HA). Gélose nutritive (GN) 12 ‰ (agar, m/v). Gélose nutritive 6 ‰ (agar, m/v). Dihydrogénophosphate de potassium (Merck 1.04873.1000). Hydrogénophosphate de potassium (Merck 1.05104.1000). Tampon phosphate stérile pH 7,0, 1 M. Ampicilline 10 g/L (Sigma-Aldrich A0166). Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich D8418). Acétone (Carlo Erba 528203). Ethanol (Carlo Erba 524125). Méthanol (Carlo Erba 525101). Eau ultra-pure stérile (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Filtres Millex-GV PVDF 0,22 µm stériles (Dutscher SLGV033RS). Micro-puits en verre stériles (diamètre interne 4 mm, diamètre externe 6 mm, hauteur 7 mm). Spectrophotomètre (Biomate 3, Fisher Bioblock, France). Extraits à tester stériles.

Mode opératoire : les tests antibactériens ont été menés sur différentes souches, à savoir *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (CIP 103214). Les tests ont été réalisés par deux méthodes : (i) la technique des disques par diffusion en gélose MH adaptée à l'utilisation de micro-puits (Antibiogramme Pasteur, Sanofi Diagnostics Pasteur), (ii) la technique des micro-puits par diffusion en gélose GN (technique interne au laboratoire).

¹ La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) est la plus faible concentration en antibiotique permettant d'obtenir après un temps de contact déterminé, une mortalité de 99,99% de la souche microbienne testée. Elle est en général de l'ordre du µg/ml voire du mg/L. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration en antibiotique capable d'inhiber toute culture visible de la souche étudiée. Elle est en général de l'ordre du µg/ml voire du mg/L. L'activité intrinsèque d'un antibiotique est directement déduite du rapport CMB/CMI : (i) CMB/CMI < 4 : activité bactéricide^(*), (ii) CMB/CMI = 8-16 activité bactériostatique^(**), CMB/CMI > 32 la bactérie étudiée est tolérante à l'antibiotique testé.

Les extraits à tester ont été resuspendus et filtrés sur 0,22 μm , à hauteur de 25 et 50 mg/mL, dans différents solvants : eau ultra-pure, acétone, DMSO/eau ultra-pure (1/9 v/v), éthanol, méthanol.

(i) Couler dans une boîte de Pétri un milieu gélosé MH 12‰. Laisser sécher. Préparer une suspension bactérienne dans du tampon phosphate à une DO comprise entre 0,10 et 0,12 ($\lambda=600$ nm) à partir d'une culture d'environ 24 h (en phase stationnaire) sur gélose non inhibitrice. Diluer ensuite la suspension dans du MH liquide à hauteur de 1/100^{ème}. Inonder le milieu gélosé MH 12 ‰ par la suspension bactérienne diluée (2-3 mL) et retirer l'excédent. Laisser sécher 30 min. Placer les micro-puits en verre dans lesquels seront inoculées les différentes solutions : 30 μL du milieu utilisé lors de la resuspension de l'échantillon testé (témoin négatif), 2 μL d'ampicilline (témoin positif), 30 μL de l'échantillon testé. Les diamètres des halos d'inhibition (mm) sont mesurés après 24 h d'incubation à 37°C.

(ii) Couler dans une boîte de Pétri un milieu gélosé GN 12 ‰. Laisser sécher. Ensemencer les 5 mL d'une GN 6 ‰ par 5 μL d'un bouillon de culture de la bactérie étudiée (12 h à 37°C). Couler la gélose molle sur le milieu GN 12 ‰. Laisser sécher 30 min. Placer les micro-puits en verre dans lesquels seront inoculées les différentes solutions : 30 μL du milieu utilisé lors de la resuspension de l'échantillon testé (témoin négatif), 2 μL d'ampicilline (témoin positif), 30 μL de l'échantillon testé. Les diamètres des halos d'inhibition (mm) sont mesurés après 24 h d'incubation à 37°C. Pour la souche d'*Enterococcus faecalis*, les milieux GN 6 ‰ et 12 ‰ ont été remplacés par des milieux TSB 6 ‰ et 12 ‰.

II.1.5.2 Antibiogrammes : activité antifongique

L'activité antifongique de différents extraits a été étudiée par des antibiogrammes, techniques de diffusion radiale d'échantillons en milieux gélosés.

Principe : Les mycètes en culture sont mis en présence d'un ou plusieurs antifongiques supposés ou connus. Les conséquences de la présence d'une molécule active sur le développement fongique sont directement observables via la formation d'halos d'inhibition autour du dépôt de l'échantillon testé. Ces halos indiquent la présence de molécules actives dans l'extrait étudié, parfois grâce à la présence d'une molécule antifongique. Un antifongique est une substance organique ayant pour action spécifique de détruire (activité fongicide) ou fortement inhiber la croissance de mycètes (activité fongistatique).

Les antifongiques peuvent (i) inhiber la synthèse de l'ergostérol, (ii) altérer la membrane cellulaire, (iii) inhiber la synthèse des β -1,3 glucanes (par inactivation de la chitine synthase), (iv) inhiber la division cellulaire en altérant la biosynthèse d'ADN ou d'ARN et (v) perturber la synthèse des protéines. De nombreuses substances antifongiques inhibant ou tuant les mycètes sont toxiques pour l'homme, même à faible dose.

Matériel et réactifs : *Candida glabrata* (DSM 6425). Agar bactériologique type E (Biokar Diagnostics A1012HA). Bouillon Levure Peptone Dextrose (YPD) (Biokar Diagnostics A1202HA). Milieu gélosé Levure Peptone Dextrose 12 ‰ (agar, m/v). Bouillon Muller Hinton (MH) (Difco 275730). Chlorure de Sodium (Sigma-Aldrich S7653). Eau physiologique stérile (9 g/L). Cycloheximide 10 g/L (Sigma-Aldrich C6255). Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma-Aldrich D8418). Acétone (Carlo Erba 528203). Ethanol (Carlo Erba 524125). Méthanol (Carlo Erba 525101). Eau ultra-pure stérile. Filtres Millex-GV PVDF 0,22 μ m stérile (Dutscher SLGV033RS). Micro-puits en verre stériles (diamètre interne 4mm, diamètre externe 6mm, hauteur 7mm). Spectrophotomètre (Biomate 3, Fisher Bioblock, France). Extraits à tester stériles.

Mode opératoire : les tests antifongiques ont été menés sur la souche *Candida glabrata* (DSM 6425). Les tests ont été réalisés par la technique des disques par diffusion en gélose MH adaptée à l'utilisation de micro-puits (Antibiogramme Pasteur, Sanofi Dignostics Pasteur). Couler dans une boîte de Pétri un milieu gélosé YPD 12 ‰. Laisser sécher. Préparer une suspension fongique dans de l'eau physiologique à une DO comprise entre 0,75 et 0,80 ($\lambda=600$ nm) à partir d'une culture d'environ 24 h (en phase stationnaire) sur gélose non inhibitrice. Diluer ensuite la suspension dans du MH liquide à hauteur de 1/100^{ème}. Inonder le milieu gélosé YPD 12 ‰ par la suspension fongique diluée (2-3mL) et retirer l'excédent. Laisser sécher 30 min. Placer les micro-puits en verre dans lesquels sont inoculées les différentes solutions : 30 μ L du milieu utilisé lors de la resuspension de l'échantillon testé (témoin négatif), 2 μ L de cycloheximide (témoin positif), 30 μ L de l'échantillon testé. Les diamètres des halos d'inhibition (mm) sont mesurés après 24 h d'incubation à 30°C.

II.2 DETERMINATION DES PROPRIETES DE SURFACE DE MICRO-ORGANISMES

II.2.1 Préparation des cellules bactériennes

Deux bactéries ont été choisies comme modèle procaryote au cours de l'étude : *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Gracieusement fournies par l'équipe du Prof. M.N. Bellon-Fontaine de l'UMR-Bioadhésion et Hygiène des Matériaux (BHM, INRA Agro-ParisTech, Massy, France), ces deux souches bactériennes présentent des propriétés physico-chimiques de surface très différentes.

II.2.1.1 Micro-organismes étudiés

L'ensemble des travaux a été réalisé avec trois espèces de micro-organismes : un bacille à coloration de Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae* (*Hafnia alvei*, CIP5731, Institut Pasteur, France) (Figure II.2-1, A), un coque à coloration de Gram positif de la famille des *Streptococcaceae* (*Lactococcus lactis*) (Figure II.2-1, B) et une micro-algue de la famille des *Naviculaceae* (*Navicula jeffreyi*, CS-46/8, CSIRO Marine and Atmospheric Research, Australie) (Figure II.2-1, C).

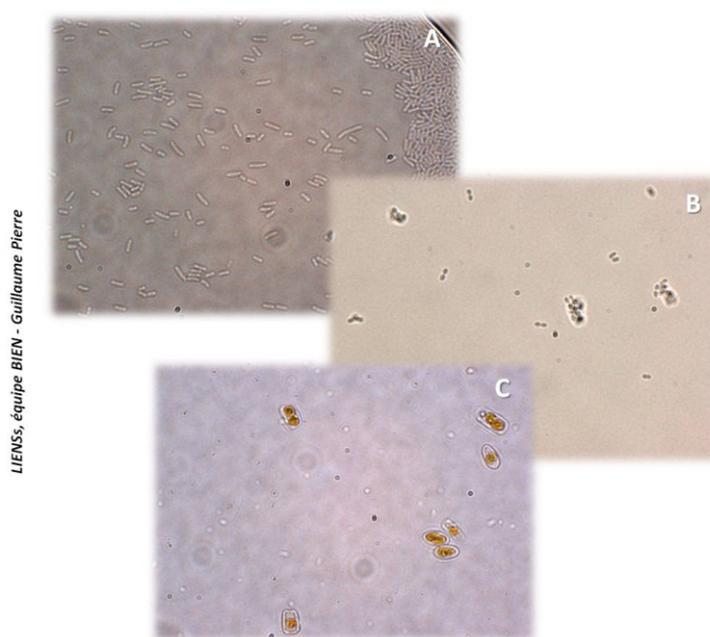


Figure II.2-1 : Etats frais (Grossissement x100) de *Hafnia alvei* (A), *Lactococcus lactis* (B) et *Navicula jeffreyi* (C). Microscopie optique : Leitz DMRB équipé d'une caméra Leica DFC310 FX (Leica, France).

II.2.1.2 Culture des bactéries

La production de biomasse bactérienne destinée à l'analyse par Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI) a nécessité une répétabilité maximale d'un point de vue protocolaire, afin d'obtenir des propriétés de surface des micro-organismes toujours identiques. Les différentes manipulations ont été réalisées sous Poste de Sécurité Microbien (HSM900NF, AES LAB, France).

Principe : les bactéries peuvent être cultivées en milieu liquide ou solide. Les milieux liquides sont utilisés pour la croissance de bactéries pures ou de bouillons bactériens. Les milieux solides sont utilisés pour l'isolement de bactéries. Ces milieux sont plus ou moins riches en nutriments et sont incubés à température optimale de croissance des bactéries étudiées.

Matériel et réactifs : souches de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei* conservées à -80°C dans 40 % de glycérol (Panreac 131339). Milieu BHI (Brain Heart Infusion, Bio Rad 64014). Milieu TSB (Trypton-Soy Broth, TSB, Biokar Diagnostics BK046HA). Glucose (Merck, 1.08342) 10 % stérile. Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Filtres Millex-GV PVDF 0,22 µm stérile (Dutscher SLGV033RS).

Milieux de croissance : *Lactococcus lactis* a été cultivée en milieu liquide cœur-cerveille (BHI) supplémenté par 0,5 % (v/v) de glucose et *Hafnia alvei* en milieu liquide caséine-soja (TSB).

Mode opératoire : à partir des souchothèques (cryotubes de 1 mL à -80°C), préparer un stock de travail en repiquant un cryotube dans 9 mL de milieu de culture correspondant à chacune des bactéries. Incuber ensuite les souches une nuit à 30°C pour *Lactococcus lactis* et à 37°C pour *Hafnia alvei*. Après incubation, mélanger 0,5 mL de chaque culture avec 0,5 mL de glycérol à 40 % dans un cryotube, puis porter à congélation à -20°C pour former le stock de travail. A partir des stocks de travail, repiquer chaque souche (1 mL) (*repiquage* « R1 ») dans 9 mL de milieu de culture adéquat, puis incuber une nuit sous agitation (*Lactococcus lactis* : 160 rpm, 30°C) (*Hafnia alvei* : 114 rpm, 37°C). Le lendemain matin, inoculer 9 mL de milieu de culture avec 1 mL de R1 puis incuber dans les mêmes conditions que précédemment (*repiquage* « R2 »).

Après une journée d'incubation, ensemercer 99 mL de milieu de culture avec 1mL de R2 de chaque culture. Laisser incuber une nuit à leur température optimale de croissance (*repiquage* « R3 »).

II.2.1.3 Culture de la micro-algue

De même que pour les cultures bactériennes de routine, la production de biomasse micro-algale destinée à l'analyse par CGI a nécessité une répétabilité maximale d'un point de vue protocolaire, afin d'obtenir des propriétés de surface des micro-organismes toujours identiques. Les différentes manipulations ont été réalisées sous Poste de Sécurité Microbien (HSM900NF, AES LAB, France).

Principe : les micro-algues sont cultivées en milieu liquide. Ces milieux sont plus ou moins riches en nutriments (matière azotée notamment) ainsi qu'en silice, et sont incubés à température optimale de croissance des micro-algues étudiées.

Matériel et réactifs : souche de *Navicula jeffreyi* conservée à -80°C dans 40 % de glycérol (Panreac 131339). Milieu F/2 50X (Sigma-Aldrich G0154). Chlorure de sodium (Sigma-Aldrich S7653). Métasilicate de sodium (Sigma-Aldrich 307815). Chlorure de potassium (Sigma-Aldrich P9333). Sulfate de magnésium heptahydraté (Sigma-Aldrich 63138). Chlorure de calcium dihydraté (Sigma-Aldrich 223506). Chlorure de calcium (Sigma-Aldrich C2661). Eau de mer artificielle 10X (EMA 10X, 234 g NaCl ; 15 g KCl ; 12 g MgSO₄, 7 H₂O ; 1,5 g CaCl₂, 2 H₂O ; 1,5 g CaCl₂ ; eau ultra-pure qsp 1 L). EMA 1X (30 practical salinity units). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Filtres Millex-GV PVDF 0,22 µm stérile (Dutscher SLGV033RS).

Milieux de croissance : *Navicula jeffreyi* a été cultivée en milieu liquide F/2 préalablement inoculé dans de l'EMA 1X à hauteur de 20 mL/L. Le milieu a par ailleurs été enrichi en silice (100mg/L).

Mode opératoire : diluer au 1/10^{ème} le milieu EMA 10X puis filtrer sur 0,22 µm le milieu EMA 1X obtenu. Inoculer 20 mL du milieu commercial F/2 dans 1 L de milieu EMA 1X stérile. Enrichir le milieu par une solution aqueuse de métasilicate de sodium à hauteur de 100 mg/L. Ajuster le pH au besoin à 8,2.

Ensemencer le milieu par une préculture de *Navicula jeffreyi* (environ 23.10^3 cellules/mL) puis placer sous agitation. Laisser la culture évoluer à 18°C dans des conditions d'alternance jour/nuit naturelles.

II.2.1.4 Préparation de la biomasse et lyophilisation

La récupération de la biomasse bactérienne (*R3f*) produite est réalisée le lendemain matin du jour suivant le « *repiquage R3* ». La récupération de la biomasse micro-algale est réalisée en début de phase stationnaire.

Principe : la biomasse récoltée pour chaque souche est lavée par de l'eau physiologique afin d'éliminer le milieu de culture ainsi que les divers déchets et métabolites produits au cours de la croissance bactérienne. Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C afin de cristalliser l'eau le plus finement possible, protégeant ainsi les parois cellulaires de risques d'éventuelles perforations. Les biomasses sont finalement lyophilisées puis conservées à 4°C. L'étape de lyophilisation est indispensable à l'analyse par CGI puisque la méthode ne s'applique qu'à des échantillons particuliers solides.

Matériel et réactifs : biomasses fraîches de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi*. Chlorure de sodium (Carlo Erba 479687). Eau physiologique stérile (9 g/L NaCl). Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France). Centrifugeuse (Sigma 3-18K/Rotor Sigma 12159-H, Fisher Bioblock Scientific, France). Lyophilisateur (HETO LyoPro 3000, France).

Mode opératoire : centrifuger chaque biomasse *R3f* (100 mL) ou micro-algale à 6000 g pendant 10 min à 4°C. Jeter le surnageant et reprendre le culot par 30mL d'eau physiologique. Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4°C. Renouveler l'opération trois fois. Après le quatrième lavage, jeter le surnageant et reprendre le culot par 10 mL d'eau physiologique diluée au 1/100^{ème}. Congeler à -80°C puis lyophiliser.

II.2.1.5 Viabilité des cellules après lyophilisation

II.2.1.5.1 Dénombrement des cellules bactériennes après lyophilisation

Afin d'évaluer la viabilité des deux souches bactériennes après lyophilisation et vérifier leur intégrité, des suivis de croissance par dénombrement en surface sur milieux gélosés ont été réalisés.

Principe : la préservation des structures cellulaires après lyophilisation est observée par une méthode d'étude de la croissance bactérienne. En se basant sur des méthodes de référence pour le dénombrement de micro-organismes aérobies revivifiés sur gélose glucosée à l'extrait de levure (Plate Count Agar, PCA), des suspensions des deux souches lyophilisées sont dénombrées sur milieux gélosés. On considère après incubation que chaque colonie provient d'une bactérie. L'indice UFC (Unité Formant Colonie), fonction du volume de suspension bactérienne étalé sur le milieu, permet de déterminer la quantité de bactéries revivifiables dans les échantillons lyophilisés. Le rapport bactéries revivifiables/population bactérienne totale est un indicateur de l'état structurel des cellules bactériennes.

Matériel et réactifs : souches lyophilisées de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Chlorure de sodium (Carlo Erba 479687). Eau physiologique stérile (9 g/L NaCl). Gélose TSB et gélose BHI supplémentée à 0,5 % (v/v) en glucose. Agar bactériologique type E (Biokar Diagnostics, A1012HA). Glucose (Merck, 1.08342) 10 % stérile. Eau ultra-pure (Maxima USF, ELGA Labwater, France).

Mode opératoire : Reprendre 130 mg de *Hafnia alvei* lyophilisée et 105 mg de *Lactococcus lactis* lyophilisée dans 20 mL d'eau physiologique. Diluer les échantillons en cascade au dixième jusqu'à 10^{-9} puis ensemencer en surface 100 μ L de chaque dilution sur gélose TSB pour *Hafnia alvei* et sur gélose BHI supplémentée à 0,5 % en glucose pour *Lactococcus lactis*. Réaliser des doublons de chaque dilution. Incuber ensuite les géloses 48 h à respectivement 37°C et 30°C. Procéder au comptage des colonies sur chaque boîte contenant au minimum 10 et au maximum 300 colonies. Déterminer la quantité de bactéries revivifiables dans l'échantillon ainsi que l'indice de viabilité cellulaire (rapport bactéries revivifiables/population bactérienne totale).

II.2.1.5.2 Analyse par Microscopie Electronique à Balayage des surfaces bactériennes

Afin de conforter les résultats obtenus par dénombrements en surface sur milieux gélosés et notamment l'indice de viabilité cellulaire, des analyses par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ont été menées sur des échantillons lyophilisés des deux souches bactériennes. L'objectif de cette observation était de vérifier l'intégrité des surfaces bactériennes après lyophilisation et de confirmer ainsi la validité de la méthode de préparation des cellules pour l'analyse de surfaces bactériennes par CGI.

Principe : brièvement, la MEB permet la formation d'images tridimensionnelles de la surface d'un échantillon par détection de rayonnements (électrons, lumière). Le balayage d'un faisceau monocinétique très fin d'électrons incidents sur la surface d'un échantillon, où se produisent des interactions détectées par un capteur (qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons), est à l'origine du phénomène. La métallisation préalable des échantillons permet de rendre conducteur la surface analysée grâce à la fine couche de métal qui va y être déposée (de l'ordre d'une centaine d'Ångström) par pulvérisation cathodique.

Matériel et réactifs : échantillons lyophilisés de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Microscope Electronique à Balayage (Quanta 200 FEG, FEI, France). Métalliseur (Sputter Coater 108Auto, Cressington, France).

Mode opératoire : à partir des souches lyophilisées de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*, métalliser quelques mg des échantillons par une fine couche d'or (200-300 Å) sous vide partiel. Observer les échantillons en mode environnemental sur un Microscope Electronique à Balayage (Quanta 200 FEG, FEI, France) au Centre Commun d'Analyses (CCA, La Rochelle, France).

II.2.2 Méthodes classiques d'analyse des propriétés globales de surface de micro-organismes

Diverses méthodes permettent de déterminer les paramètres physico-chimiques de surface, indispensables à la compréhension des mécanismes d'adhésions bactériennes. Chacune de ces méthodes permet, à des niveaux microscopiques différents, d'étudier les propriétés de surface de micro-organismes via la détermination de caractéristiques énergétiques des surfaces de cellules bactériennes. La zétamétrie qui permet d'accéder à la charge globale de cellules bactériennes, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier qui permet de déterminer la composition moléculaire de surface de cellules bactériennes, la mesure d'angles de contact, la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents) ou encore la Microscopie de Force Atomique (AFM) sont certaines des méthodes de caractérisation les plus utilisées.

II.2.2.1 Charge globale de surface de cellules bactériennes

Principe : les propriétés électriques de micro-organismes planctoniques peuvent être évaluées par des mesures de mobilité électrophorétique sur une gamme de pH allant de 2 à 9. Suspendus dans une solution de conductivité connue, les micro-organismes étudiés sont capables, sous l'influence d'un champ électrique (E), de se déplacer. Le sens de leur déplacement permet de déterminer le signe de leur charge globale et leur mobilité électrophorétique (ME) peut être déduite à partir de l'Équation I.2-22.

Il est important de rappeler qu'en fonction de la souche étudiée, il est parfois nécessaire de s'affranchir de la mobilité autonome des cellules microbiennes si celles-ci sont équipées de flagelles.

Matériel et réactifs : souches bactériennes fraîches de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Chlorure de sodium (Sigma-Aldrich S7653). Eau physiologique diluée au 1/100^{ème} (90 mg/L NaCl). Acide nitrique dilué (Sigma-Aldrich 438073). Zétamètre laser (CAD instrumentation, France). Microscope BX 40 (Olympus, France). Système d'analyse d'images.

Mode opératoire : resuspendre les cellules bactériennes fraîches dans 200 mL d'eau physiologique diluée au 1/100^{ème} (à la place des 10 mL d'eau physiologique décrit en partie II.2.1.2, p. 143).

Des mesures de mobilité électrophorétique sont réalisées sur une gamme de pH allant de 2 à 6, le pH étant ajusté par une solution diluée d'acide nitrique, sous un champ électrique de 50 Volts à l'aide d'un Zétamètre laser (CAD instrumentation, France) conjugué à un microscope (BX 40, Olympus, France) et à un système d'analyse d'image, capable d'analyser environ 200 particules à chaque mesure.

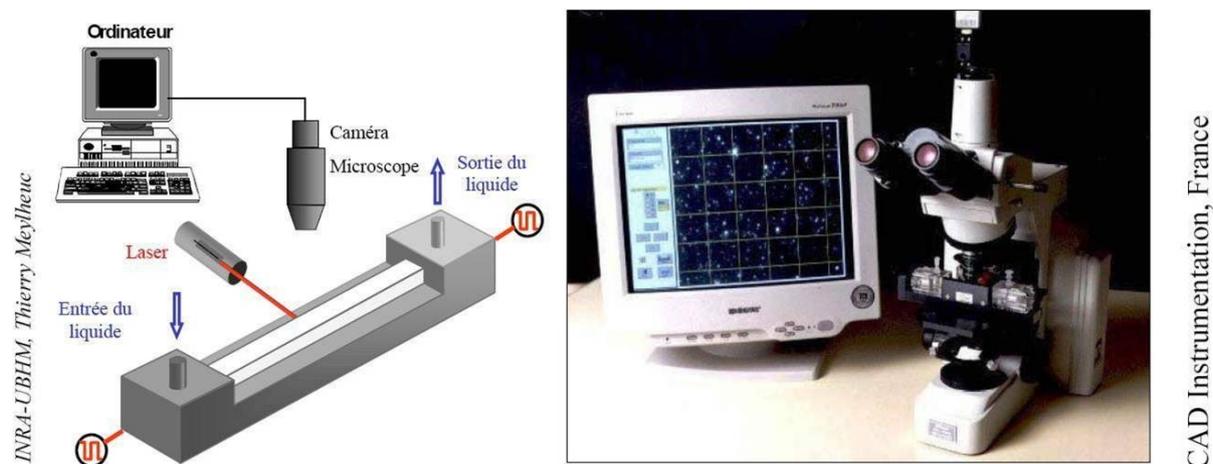


Figure II.2-2 : Dispositif expérimental du zétamètre laser zetaphotometer II®.

II.2.2.2 Composition moléculaire de surface de cellules bactériennes

La technique est couramment employée pour l'identification de composés purs ou même pour déterminer la composition d'un mélange complexe.

Principe : méthode physique d'analyses chimiques, la spectrométrie infrarouge se base sur le mode de vibration d'une molécule dans l'infrarouge. La spectroscopie infrarouge n'est pas considérée comme une technique sensible lors de l'étude de la surface de micro-organismes lyophilisés puisque le faisceau infrarouge pénètre entièrement les cellules. Toutefois, de nombreux auteurs considèrent que cette technique reflète globalement la composition moléculaire de surface de micro-organismes et que les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus par d'autres techniques d'analyse de propriétés de surface (angle de contact, zétamétrie).

Matériel et réactifs : souches lyophilisées de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* conservées à 4 et 40°C. Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (Spectrum 100 FTIR, Perkin Elmer, France) équipé d'un module ATR et d'un cristal en diamant. L'analyse des résultats est réalisée via l'utilisation du logiciel Spectrum (version 6.1.0).

Mode opératoire : chaque souche lyophilisée est conservée à 4 et 40°C. Des analyses par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier sont réalisées pour chacune en déposant quelques mg d'échantillons dans l'appareil. La résolution spectrale est de 4 cm⁻¹ et 20 scans sont mesurés et moyennés pour chaque échantillon testé. Les aires des bandes d'absorption les plus importantes sont déterminées par intégration après soustraction du bruit de fond, correction de la ligne de base, affinement du spectre et normalisation en respectant l'aire de la région d'absorption des CH aux alentours de 2930 cm⁻¹. Chaque analyse est triplée, sur trois cultures séparées de chacun des micro-organismes étudiés.

II.2.2.3 Mesure des angles de contact de surfaces bactériennes

Les caractéristiques énergétiques de surface des cellules bactériennes ont été obtenues à partir de mesure d'angles de contact de gouttes déposées à la surface de tapis bactériens à l'aide d'un goniomètre.

Principe : la mesure d'angles de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte déposée sur une surface à étudier. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. La mesure de l'angle de contact, formé entre la base de la goutte de solvant et la surface sera synonyme de son affinité pour cette dernière. Plus l'angle θ est important et plus la surface étudiée sera considérée comme peu affine pour le solvant. Le solvant utilisé pour former la goutte est le plus souvent de l'eau de qualité supérieure afin de déterminer le caractère hydrophile/hydrophobe de la surface étudiée. D'autres solvants (diiodométhane, formamide, éthylène glycol, ...) sont indispensables pour étudier de manière exhaustive les propriétés de surface de tapis bactériens selon le modèle de Good-van Oss.

Ainsi, au moins trois liquides purs de caractéristiques énergétiques connues doivent être utilisés. L'énergie de surface du support étudié γ_s , ainsi que ses composantes de Lifshitz-van der Waals γ^{LW} , donneur d'électrons (ou Lewis-base) γ^- et accepteur d'électrons (ou Lewis-acide) γ^+ sont déterminées à partir de l'équation de Young-van Oss. Connaissant les énergies de surface des trois liquides utilisés, les composantes du support peuvent être calculées grâce à un système de trois équations à trois inconnues.

$$\text{cf. Équation I.2-38} \quad \gamma_L(1 + \cos \theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right)$$

Matériel et réactifs : souches bactériennes fraîches et lyophilisées de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi*. Eau distillée (Infilco). Diiodométhane (Sigma-Aldrich 158429). Formamide (Sigma-Aldrich F9037). Ethylène glycol (Sigma-Aldrich 324558). Système de filtration sur Büchner. Microscope Electronique à Balayage (Quanta 200 FEG, FEI, France). Métalliseur (Sputter Coater 108 Auto, Cressington, France). Goniomètre (G10, Krüss, Allemagne), équipé d'un module de caméra vidéo CCD, traitement des images via le Logiciel Drop Shap Analysis, version 1.65.049.

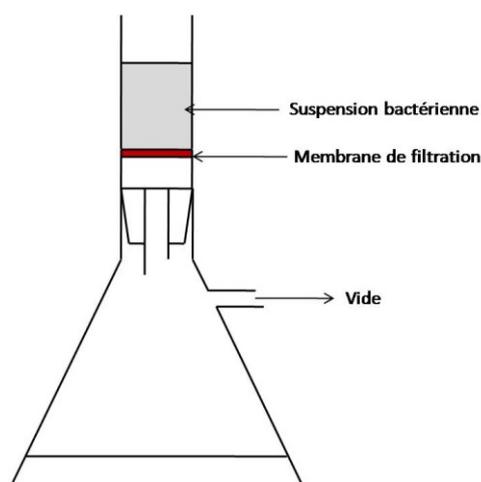


Figure II.2-3 : Appareillage nécessaire à la préparation des tapis bactériens, d'après van der Mei et al. (1991).

Mode opératoire : les mesures d'angles de contact ont été réalisées sur des tapis bactériens déposés préalablement sur des membranes de filtration. Déposer 40 mL d'une suspension bactérienne fraîche ou resuspendue dans de l'eau déminéralisée à partir d'un échantillon lyophilisé (environ $4,5 \times 10^{10}$ cellules/mL) sur une membrane de filtration en triacétate de cellulose d'une porosité de $0,45 \mu\text{m}$.

Réaliser la filtration sous vide léger selon la méthode d'Ernst Büchner. Placer ensuite les filtres sur des milieux gélosés (1 % agar) enrichis en glycérol (10 %, v/v) pour conserver une certaine humidité et permettre un stockage des tapis (4 h au maximum). Trois cultures séparées sont déposées sur trois filtres et ce pour les trois micro-organismes étudiés : *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi*. Placer les filtres sur des boîtes de Pétri vides et laisser à sécher sous un PSM de 30 à 90 min (van der Mei *et al.* 1991), de façon à obtenir une certaine stabilité lors de la mesure des angles de contact. L'humidité des filtres est laissée à l'appréciation du manipulateur et doit permettre de travailler sur des filtres très légèrement humides pour éviter des phénomènes néfastes d'absorption lors du dépôt des solvants. L'homogénéité et la cohésion des tapis bactérien sont vérifiées en routine par Microscopie Electronique à Balayage (Quanta 200 FEG, FEI, France) sous vide partiel. Les échantillons sont au préalable métallisés par une couche d'or (200-300 Å) sous vide.

Les angles de contact θ sont mesurés à une température ambiante de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, en utilisant la méthode de la goutte posée, à l'aide d'un goniomètre (G40, Krüss, Allemagne). Quatre solvants purs de caractéristiques énergétiques connus sont utilisés comme solvant (Tableau II.2-2) : l'eau distillée, le diiodométhane, le formamide et l'éthylène glycol. L'énergie de surface des supports γ_s , ainsi que leurs composantes de Lifshitz-van der Waals γ^{LW} , donneur d'électrons (ou Lewis-base) γ^- et accepteur d'électrons (ou Lewis-acide) γ^+ sont déterminées grâce à un système de trois équations à trois inconnues.

II.2.2.4 Méthode de partition MATS

Principe : la méthode de partition MATS, basée sur la comparaison d'affinité de cellules bactériennes pour un solvant monopolaire (acide ou basique) et un solvant apolaire, les deux possédant la même énergie libre de surface liée au caractère Lifshitz-van der Waals, permet de caractériser les propriétés de surface de micro-organismes planctoniques. Le caractère hydrophile/hydrophobe et les propriétés Lewis acide/base de cellules bactériennes peuvent être déterminées via l'utilisation de cette technique. Deux couples de solvants sont utilisés : le couple chloroforme (solvant accepteur d'électrons)/hexadécane et le couple acétate d'éthyle (solvant donneur d'électron)/décane.

Le pourcentage d'affinité des bactéries aux solvants est déduit de la relation :

cf. **Équation I.2-40** $Affinité (\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100$

où A_0 correspond à la densité optique d'une suspension bactérienne ajustée à une densité optique de 0,8 à 400 nm et A_1 correspond à la densité optique (mesurée à 400 nm) de la phase aqueuse après décantation de la suspension bactérienne et des différents solvants.

Matériel et réactifs : souches bactériennes fraîches de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Solution de chlorure de sodium 150 mM (Sigma-Aldrich S7653). Solvants (Sigma-Aldrich) : chloroforme (C2432), hexadécane (296317), acétate d'éthyle (270989), décane (457116). Tubes à hémolyse. Spectrophotomètre (Genesys Spectronic 20, Geneq inc, France).

Mode opératoire : 2,4 mL de suspension bactérienne ajustée à une densité optique d'environ 0,8 (soit 10^9 Unité Formant Colonie/mL) à 400 nm (A_0) avec une solution de NaCl 150mM sont vortexés avec 0,4 mL de chacun des solvants pendant 2 minutes afin d'obtenir une émulsion. Après 15 min de décantation, la densité optique de la phase aqueuse (A_1) est mesurée à 400 nm. On déduit ensuite le pourcentage d'affinité des bactéries aux solvants pour les différents solvants utilisés.

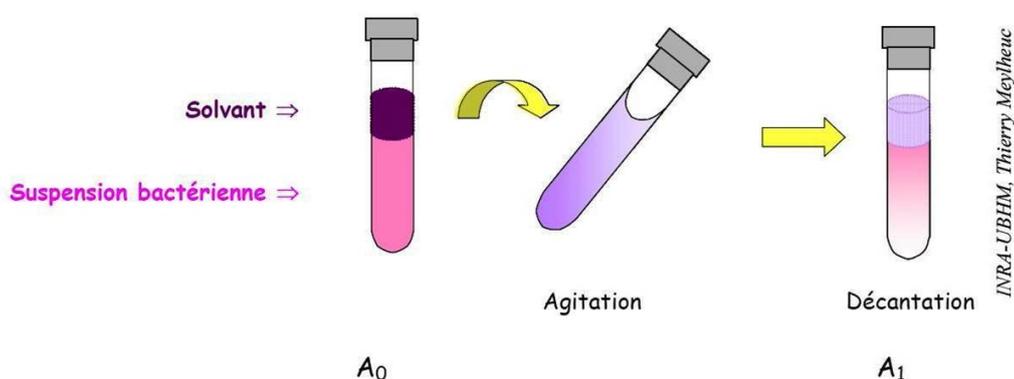


Figure II.2-4 : Représentation schématique du test MATS permettant la mesure de l'affinité de cellules microbiennes pour différents solvants d'après Allion (2003).

II.2.2.5 Caractérisation de la surface de micro-organismes par Microscopie de Force Atomique

Principe : le capteur est un ressort-lame (ou cantilever), encastré à une extrémité et muni d'une pointe à l'autre. La lecture de la déflexion du ressort s'effectue par la mesure de la déviation d'un faisceau lumineux, émis par une diode laser, et réfléchi par l'extrémité du cantilever grâce à une diode photoélectrique segmentée. La connaissance de l'éclaircissement reçu par les différents cadrans, pour une géométrie donnée, donne ainsi accès aux angles de déflexion et de torsion à l'extrémité du cantilever et donc aux déplacements du capteur sur la surface étudiée (Allion 2003). La pointe effleure la surface de l'échantillon et le déplacement du capteur permet d'en déterminer sa topographie.

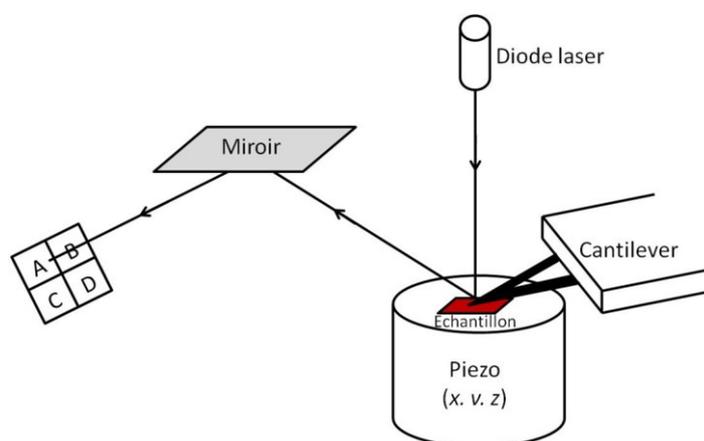


Figure II.2-5 : Représentation schématique d'un microscope de force atomique d'après Allion (2003).

Matériel et réactifs : souches de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* préalablement déposées sous forme de suspensions bactériennes puis séchées sur des lames de polysine. Système AFM Pico SPM (Molecular Imaging, Scientec, France).

Mode opératoire : les images en mode contact ont été réalisées à force constante avec des pointes en nitrure de silicium. La force appliquée était très faible, de manière à ne pas endommager la topographie des échantillons.

II.2.3 Détermination des propriétés de surface de micro-organismes par Chromatographie Gazeuse Inverse

II.2.3.1 Mise au point de la méthode d'analyse

L'analyse des propriétés de surface des cellules bactériennes par CGI a nécessité la mise au point de protocoles expérimentaux précis en optimisant au mieux les paramètres susceptibles de faire varier les analyses, et ce afin d'obtenir une meilleure fiabilité et reproductibilité des résultats. Pour cela, il a été indispensable d'étudier l'influence de plusieurs paramètres expérimentaux tels que (i) le choix des molécules sondes utilisées pour l'analyse et leurs pressions partielles, (ii) la préparation du lit fixe bactérien composant la colonne chromatographique, (iii) l'incorporation de différents solides de dilution à la phase stationnaire afin d'homogénéiser au mieux le lit bactérien. Une combinaison optimale de ces paramètres a pour but d'améliorer le passage du flux gazeux dans la phase stationnaire et d'influencer directement l'étude des propriétés de surface des cellules bactériennes en permettant une analyse plus fine de leurs propriétés physico-chimiques.

II.2.3.1.1 Solutés injectés : les molécules sondes

Principe : l'analyse par CGI de tout corps nécessite un choix rigoureux des sondes gazeuses qui vont s'adsorber sur ce même corps. Le choix des sondes utilisées a été fonction des propriétés acide-base de Lewis de ces dernières, en s'appuyant sur leurs valeurs d'AN et de DN respectives. Les deux paramètres AN (nombre accepteur) et DN (nombre donneur) définissent le caractère acide et basique des sondes. DN (Kcal/mol) mesure l'énergie d'une liaison de coordination entre un atome donneur et un acide de Lewis référent (SbCl_5), dans une solution de 1,2-dichlorométhane (Mukhopadhyay & Schreiber 1995). AN (sans dimension) est déterminé à partir du déplacement chimique du profil relatif ^{31}P obtenu par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de la base de Lewis référent (Et_3PO_4) dissoute dans l'acide de travail. AN* (Kcal/mol) correspond aux valeurs corrigées d'AN, en considérant la valeur d'AN du Et_3PO_4 égale à 40 Kcal/mol (Bos *et al.* 1999). Ainsi, l'interaction particulière et spécifique de chaque sonde avec la phase stationnaire à analyser permet d'en déduire ses propriétés physico-chimiques de surface.

D'autre part, le choix des sondes gazeuses a également été fonction des solvants utilisés dans la technique MATS pour déterminer les propriétés acide-base de Lewis de la surface bactérienne. Ainsi, un choix judicieux de sondes usuellement utilisées par cette technique permet de comparer plus facilement les résultats obtenus par CGI avec ceux obtenus par la méthode MATS.

Pour finir, la détermination de la composante dispersive de l'énergie de surface est possible grâce à l'utilisation de cinq sondes apolaires (alcanes), de groupement méthylène décroissant.

Matériel et réactifs : acétone (Carlo Erba, 400971), chloroforme (Carlo Erba, 438601), acétate d'éthyle (Sigma-Aldrich, 270989), 1,4-dioxane (Sigma-Aldrich, 443557), undécane (Sigma-Aldrich, 94002), décane (Sigma-Aldrich, 30550), nonane (Sigma-Aldrich, 74252), octane (Sigma-Aldrich, O2001), heptane (Sigma-Aldrich, 246654).

Mode opératoire : dans le cadre de cette étude, les sondes polaires suivantes ont été utilisées : acétone, chloroforme, acétate d'éthyle et 1,4-dioxane. Le chloroforme est un acide de Lewis (accepteur d'électrons, d'AN* relativement élevé et de DN nul) qui interagit avec les surfaces basiques, l'acétone et l'acétate d'éthyle sont des amphotères plutôt basiques et le 1,4-dioxane est une base de Lewis (donneur d'électrons, de DN élevé et d'AN* nul) qui interagit avec les surfaces acides (Tableau II.2-1). La rétention de ces sondes dans la colonne est donc représentative de leur affinité pour le lit de cellules et par suite du caractère acide/base de Lewis de ces cellules. Afin de déterminer la composante dispersive de l'énergie de surface, les alcanes suivants ont été utilisés: undécane (C_{11}), décane (C_{10}), nonane (C_9), octane (C_8), heptane (C_7). Les valeurs d'enthalpie libre d'adsorption spécifique des sondes polaires sur les cellules et de la composante dispersive de l'énergie de surface des cellules ont été calculées à partir des constantes décrites dans le Tableau II.2-1.

Tableau II.2-1 : Propriétés des sondes utilisées en CGI

Sondes	Composante dispersive d'énergie γ_L^D (J/m ²)	Aire de section (m ²)	AN* (Kcal/mol)	DN (Kcal/mol)
Undécane	0,0239	8,1 x 10 ⁻¹⁹	-	-
Décane	0,0227	7,44 x 10 ⁻¹⁹	-	-
Nonane	0,0213	6,96 x 10 ⁻¹⁹	-	-
Octane	0,0203	6,49 x 10 ⁻¹⁹	-	-
Heptane	0,0184	5,92 x 10 ⁻¹⁹	-	-
Acétone	0,0165	3,14 x 10 ⁻¹⁹	2,5	17
Chloroforme	0,0272	2,95 x 10 ⁻¹⁹	5,4	-
Acétate d'éthyle	0,0239	3,3 x 10 ⁻¹⁹	1,5	17,1
1,4-Dioxane	0,0332	4,20 x 10 ⁻¹⁹	-	14

II.2.3.1.2 Phase stationnaire : le lit bactérien

Principe : la bonne préparation du lit fixe bactérien composant la colonne chromatographique est essentielle pour une analyse optimale des propriétés de surface de la phase stationnaire par CGI. Les cellules bactériennes, avec ou sans support de dilution, doivent être suffisamment tassées pour occuper de façon homogène la colonne sans pour autant colmater cette dernière et empêcher le passage du flux gazeux. L'aspect visuel, la hauteur du lit de cellules (fonction de la masse incorporée) ainsi que l'évolution de la pression engendrée par le passage du flux gazeux sur le lit bactérien sont des indicateurs de la bonne préparation des colonnes chromatographiques.

Matériel et réactifs : souches bactériennes lyophilisées de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi*. Supports de dilution : Chromosorb P AW-DMCS¹ 60-80 mesh (Interchim, 094670), Polytétrafluoroéthylène 100µm (Sigma-Aldrich, 468118). Colonne de verre (longueur : 30 cm, diamètre interne : 2 mm, diamètre externe : 6 mm) inactivée au diméthylchlorosilane (DMCS). Laine de verre silanisée (Supelco, 2-0411).

Mode opératoire : les cellules bactériennes ou micro-algales seules ou en présence de support sont tassées dans des colonnes de verre diméthylchlorosilane (DMCS) entre deux couches de laine de verre. La hauteur du lit est fonction de la masse de cellules et de l'utilisation de supports de dilution (cf. II.2.3.1.3.1-2, p. 160).

¹ AW-DMCS : lavé à l'acide et traité au diméthylchlorosilane.

La pression engendrée par le passage du flux gazeux dans la colonne doit être raisonnable (inférieure à 1800 torrs) et fixe. Elle doit nécessairement rester constante au cours des manipulations afin de s'affranchir des risques de formation de *macro-* ou *micro-* chemins préférentiels qui faciliteraient le passage du flux gazeux au travers du lit bactérien.

II.2.3.1.2.1 Période de conditionnement des colonnes chromatographiques

Principe : afin d'étudier les propriétés de surface de la phase stationnaire de manière optimale par CGI, la colonne chromatographique doit être conditionnée. La période de conditionnement va permettre à la colonne de s'équilibrer et d'atteindre les conditions d'analyse requises de manière durable et fixe.

Matériel et réactifs : colonne de verre DMCS contenant le lit bactérien. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID).

Mode opératoire : installer la colonne dans le système. Laisser s'équilibrer la colonne pendant 8 h dans les conditions constantes suivantes de température (40°C), de débit (10 ccm¹) et d'humidité nulle.

II.2.3.1.2.2 Dilution infinie : domaine d'application de la loi d'Henry

Principe : l'analyse par CGI en dilution infinie consiste en l'injection de molécules sondes en quantités très faibles (concentrations quasi-nulles). Dans ces conditions, la loi d'Henry est applicable et l'on considère que la quantité de molécules sondes adsorbées est proportionnelle à la surface totale de la phase stationnaire.

Matériel et réactifs : souche de *Rhizobium sp.* lyophilisée. Chromosorb P AW-DMCS 60-80 mesh (Interchim, 094670). Sondes polaires et apolaires. Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme (FID).

¹ Centimètre cube par minute dans les conditions suivantes : température = 0°C et pression = 101.325 kPa.

Mode opératoire : préparer un lit homogène de 500 mg dans une colonne de verre DMCS en mélangeant des cellules de *Rhizobium sp.*¹ à du Chromosorb (support inerte de dilution) dans des proportions fixées à 1/1 respectivement (m/m). L'utilisation de Chromosorb a permis la formation d'un lit fixe homogène au travers duquel le flux gazeux a pu s'établir correctement dans tout le volume de la colonne, paramètre indispensable à l'application de la loi d'Henry. Deux quantités différentes de molécules sondes ont été testées : $\frac{p}{p_0} = 0.05$ et $\frac{p}{p_0} = 0.025$ où p est égale à la pression partielle du soluté en phase gazeuse et p_0 la pression de vapeur saturante du soluté à la température d'étude des cellules, soit 40°C.

II.2.3.1.3 Faisabilité de la méthode : optimisation

Nous avons supposé que l'élaboration de phases stationnaires à partir de micro-organismes seuls pouvait être problématique, notamment à cause de la petite taille des particules analysées. En effet, il a été supposé qu'une colonne uniquement remplie par des cellules bactériennes pourrait être à l'origine de problèmes de surpression majeurs en amont de la colonne. L'augmentation non négligeable de la pression, liée directement à la résistance opposée au gaz par des cellules bactériennes de très petites tailles, serait à l'origine de la création de *macro*- chemins préférentiels dans la colonne, induisant une chute de pression et une percolation non homogène du lit bactérien. Cette partie de l'étude a donc consisté en l'optimisation de la méthode d'analyse par CGI en faisant varier différents paramètres, en particulier via l'utilisation de supports de dilution lors de l'élaboration des colonnes chromatographiques. Les améliorations apportées à la méthode sont successives et découlent les unes des autres. De ce fait, l'utilisation d'un paramètre préalablement optimisé et nécessaire à l'optimisation d'un nouveau paramètre sera indiqué d'un ^(par. opt.) pour plus de clarté. Les choix optimaux pour chacun des paramètres étudiés sont commentés dans la partie III consacrée aux résultats.

¹ La détermination de la quantité optimale de sondes à injecter pour atteindre la dilution infinie a été réalisée à partir d'une biomasse abondante de *Rhizobium sp.* utilisée au laboratoire, les souches modèles n'étant pas encore disponibles à cette même période.

II.2.3.1.3.1 Les supports de dilution : préparation d'un lit bactérien réellement homogène

Principe : afin de maintenir la pression constante dans la colonne et éviter la formation de *macro-* et *micro-* chemins préférentiels, une dilution des cellules bactériennes est nécessaire à l'obtention d'une phase stationnaire homogène. Le support idéal de dilution est constitué de petites particules sphériques uniformes qui présentent une bonne résistance mécanique. Dans cette étude, deux supports plus ou moins inertes (qui n'interagissent pas avec les molécules injectées) ont été testés : (i) des billes de tailles moyennes d'environ 100 μm de Polytétrafluoroéthylène (Téflon), polymère hydrophobe de charge nulle et, (ii) des particules de Chromosorb, constituées de squelettes de silice de milliers d'espèces d'algues unicellulaires (diatomées). Leurs débris forment un sédiment (terre de diatomées) qui constitue un support de choix pour la Chromatographie en Phase Gazeuse. Le traitement au diméthylchlorosilane de leurs surfaces, précédé d'un lavage à l'acide, permet la neutralisation des groupements silanol du support.

Matériel et réactifs : échantillons de Chromosorb P AW-DMCS 60-80 mesh (Interchim, 094670) et de Polytétrafluoroéthylène (Téflon) 100 μm (Sigma-Aldrich, 468118). Microscope Electronique à Balayage (JSM-5410 LV, JEOL, France). Métalliseur (Sputter Coater 108Auto, Cressington, France).

Mode opératoire : à partir des deux supports de dilution, métalliser quelques mg des échantillons par une fine couche d'or (200-300 Å) sous vide partiel afin de préparer les échantillons à l'observation par MEB. L'observation des surfaces des deux supports a été effectuée sur un Microscope Electronique à Balayage (JEOL JSM 5410 LV) sous vide partiel, au Centre Commun d'Analyses (CCA, La Rochelle, France).

II.2.3.1.3.2 Masse de la phase stationnaire à analyser

Principe : l'optimisation de la masse de cellules à utiliser en présence de support de dilution pour la préparation des colonnes doit permettre l'obtention de spectres chromatographiques d'une qualité suffisante à l'exploitation des résultats. En effet, le lit de cellules doit être suffisamment étendu pour permettre une percolation correcte des sondes injectées.

La finesse des pics chromatographiques et des différences significatives des temps de rétention de chaque sonde sont des indicateurs de la qualité de l'analyse. La pression du flux gazeux en tête de colonne, quant à elle, ne doit pas être trop élevée (inférieure à 1800 torrs) et doit rester constante durant l'analyse, attestant de l'absence de formation de chemins préférentiels.

Matériel et réactifs : souche de *Rhizobium sp.* lyophilisée. Chromosorb P AW-DMCS 60-80 mesh (Interchim, 094670). Sondes polaires et apolaires. Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme.

Mode opératoire : préparer différents lits homogènes de 200, 300, 350, 400, 450 et 500 mg dans des colonnes de verre DMCS en mélangeant des cellules de *Rhizobium sp.*¹ à du Chromosorb dans des proportions 1/1 respectivement (m/m). Injecter une quantité de sondes $\frac{P}{P_0}$ constante et fixe de 0,025^(par. opt.).

II.2.3.1.3.3 Ratio optimal cellules bactériennes/supports de dilution

Principe : comme il l'a été explicité précédemment, la dilution des cellules bactériennes par différents supports de dilution nécessite de déterminer le ratio bactéries/support (m/m) le mieux adapté. L'évolution de la pression dans la colonne, l'aspect du lit et les temps de rétention des sondes sont autant de paramètres qui permettent de choisir le ratio idéal entre les bactéries et les supports de dilution. Ainsi, on considérera que le meilleur ratio sera obtenu lorsque la pression restera constante durant la totalité des analyses (synonyme d'une bonne percolation du gaz), sans formation de zones de vide dans la colonne au cours de l'analyse (attestant de l'absence de chemin préférentiel) et lorsque les temps de rétention de chaque sonde seront significativement différents (séparation suffisante des sondes). En outre, il est important de vérifier l'état de la répartition des bactéries à la surface des billes de support.

¹ La détermination de la masse optimale de la phase stationnaire à analyser a été réalisée à partir d'une biomasse abondante de *Rhizobium sp.* utilisée au laboratoire, les souches modèles n'étant pas encore disponible à cette même période.

Des analyses par Microscopie Electronique à Balayage peuvent permettre de vérifier la formation d'un lit fixe homogène de particules de support recouvertes en partie de cellules bactériennes, dont les propriétés de surface pourront alors être correctement évaluées par CGI, par différence avec les résultats obtenus avec les supports seuls.

Matériel et réactifs : souches lyophilisées de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Chromosorb P AW-DMCS 60-80 mesh (Interchim, 094670). Polytétrafluoroéthylène (Téflon) 100 μm (Sigma-Aldrich, 468118). Sondes polaires et apolaires. Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme.

Microscope Electronique à Balayage (JSM-5410 LV, JEOL, France). Métalliseur (Sputter Coater 108Auto, Cressington, France).

Mode opératoire : préparer différents échantillons des deux souches bactériennes mélangées à du Téflon dans des proportions 1/19, 1/11, 1/5, 1/3 et 1/0 respectivement (m/m). Les conditions optimisées suivantes ont été sélectionnées pour l'analyse en CGI : quantité de molécules sondes injectées $\frac{P}{P_0} = 0,025^{(\text{par. opt.})}$, masse du mélange cellules/support = 500 $\text{mg}^{(\text{par. opt.})}$.

Préparer plusieurs mélanges homogènes binaires de *Lactococcus lactis* et d'*Hafnia alvei* avec du Chromosorb et du Téflon dans les proportions optimales à l'analyse par CGI de bactéries/support = $1/5^{(\text{par. opt.})}$ respectivement (m/m). L'observation microscopique a été réalisée par MEB (JSM-5410 LV, JEOL, France) sous vide partiel sur les différents mélanges binaires préalablement métallisés par une fine couche d'or (200-300 Å) sous vide partiel.

II.2.3.2 Analyse des propriétés de surface de différents micro-organismes par CGI

II.2.3.2.1 Procaryotes modèles : *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*

Principe : dans un dernier temps, les propriétés de surface des deux souches bactériennes sont analysées par CGI, en fonction des paramètres expérimentaux optimaux déduits des expériences décrites précédemment.

Matériel et réactifs : souches lyophilisées de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. Chromosorb P AW-DMCS 60-80 mesh (Interchim, 094670). Polytétrafluoroéthylène (Téflon) 100 µm (Sigma-Aldrich, 468118). Sondes polaires et apolaires. Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme.

Mode opératoire : préparer des lits bactériens homogènes de chaque souche en les mélangeant avec les différents supports de dilution. Les meilleurs paramètres pour la détermination de leurs propriétés physico-chimiques ont été : quantité de sondes injectées $\frac{P}{P_0}$ constante égale à 0,025, masse totale du mélange de 500 mg avec du Téflon, masse totale du mélange de 550 mg avec du Chromosorb, ratio de 1/5 (m/m) entre bactéries et support.

II.2.3.2.2 Eucaryote modèle : *Navicula jeffreyi*

Principe : les propriétés de surface de *Navicula jeffreyi* sont analysées par CGI, en fonction des paramètres expérimentaux optimaux déduits des expériences décrites précédemment.

Matériel et réactifs : souches lyophilisées de *Navicula jeffreyi*. Chromosorb P AW-DMCS 60-80 mesh (Interchim, 094670). Polytétrafluoroéthylène (Téflon) 100 µm (Sigma-Aldrich, 468118). Sondes polaires et apolaires. Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme.

Mode opératoire : préparer des lits de micro-algues homogènes en les mélangeant avec les différents supports de dilution. Les meilleurs paramètres pour la détermination de leurs propriétés physico-chimiques ont été : quantité de sondes injectées $\frac{P}{P_0}$ constante égale à 0,025, masse totale du mélange de 500 mg avec du Téflon, masse totale du mélange de 550 mg avec du Chromosorb, ratio de 1/5 (m/m) entre bactéries et support.

II.2.3.2.3 Importance de la composition de la phase stationnaire dans la détermination des propriétés de surface de micro-organismes

Principe : des analyses de phases stationnaires uniquement constituées par les bactéries *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei* sont réalisées par CGI. Ces analyses ont pour but de confirmer si l'utilisation de supports de dilution (Téflon et Chromosorb) est réellement optimale pour la bonne caractérisation des propriétés de surface de micro-organismes. En effet, il est possible que l'addition de ces supports relativement inertes soit à l'origine de modifications significatives de l'état physiologiques des cellules bactériennes (cf. II.2.3.1.3.3, p. 161). Dans ce cas, les propriétés de surface mesurées pourraient décrire la surface de cellules adhérees (ou partiellement adhérees) et non de cellules microbiennes réellement « libres ».

Matériel et réactifs : souches lyophilisées de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei*. Sondes polaires et apolaires. Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme.

Mode opératoire : préparer des lits bactériens homogènes de chaque souche. Les meilleurs paramètres pour la détermination de leurs propriétés physico-chimiques ont été : quantité de sondes injectées $\frac{P}{P_0}$ constante égale à 0,025, masse totale du mélange de 500 mg avec du Téflon, masse totale du mélange de 550 mg avec du Chromosorb, pas d'utilisation de supports de dilution.

II.2.3.2.4 Détermination de plusieurs composantes d'énergie décrivant la surface de micro-organismes « libres »

Principe : l'utilisation de la CGI doit permettre la détermination de paramètres physico-chimiques directement comparables aux énergies de surface calculées par la méthode référence de mesure d'angles de contact.

L'utilisation d'une nouvelle combinaison de molécules sondes, à savoir le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le toluène, permet de calculer différentes composantes de l'énergie de surface de micro-organismes :

- les composantes γ_S^+ et γ_S^- , se rapportant respectivement au caractère accepteur d'électrons (acidité) et donneur d'électrons (basicité), afin de déterminer la composante acide-base γ_S^{AB} qui tient compte des possibilités d'interactions acide/base,

$$\text{Équation II.2-1} \quad \gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^+ \times \gamma_S^-}$$

- la composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^D , reflétant l'aptitude du solide à échanger des forces de London,
- la composante totale de l'énergie de surface γ_S^t , selon l'Équation II.2-2 :

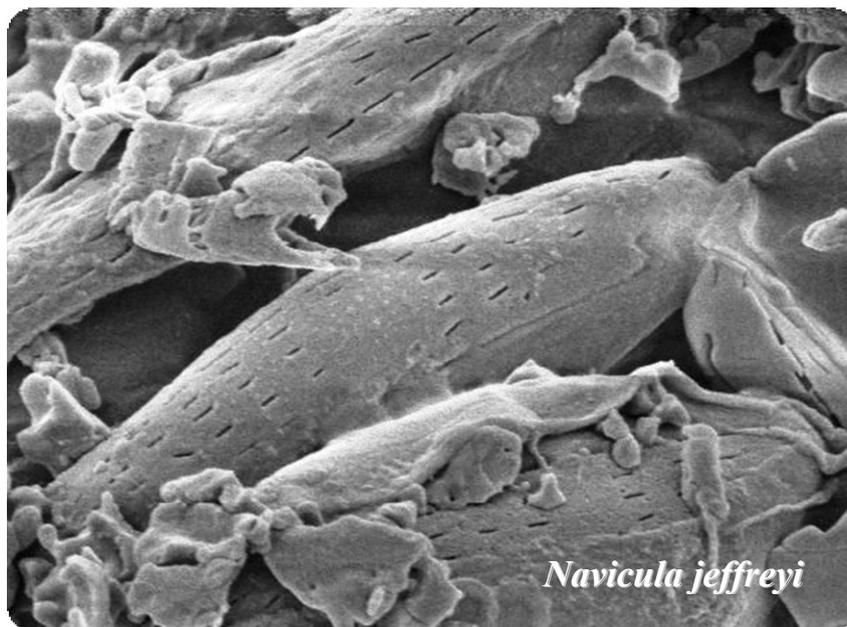
$$\text{Équation II.2-2} \quad \gamma_S^t = \gamma_S^d + \gamma_S^{AB}$$

Tableau II.2-2 : Propriétés des nouvelles sondes polaires utiles à la détermination des énergies de surface de cellules bactériennes par CGI.

Sondes	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	Chloroforme	Toluène
Aire de section (m ²)	2,99.10 ⁻¹⁹	3,29.10 ⁻¹⁹	3,51.10 ⁻¹⁹	4,20. 10 ⁻¹⁹
γ_1^+ (mJ/m ²)	5,20	0,00	3,80	0,00
γ_1^- (mJ/m ²)	0,00	19,20	0,00	2,30
γ_1^t (mJ/m ²)	26,50	23,90	27,20	28,50

Matériel et réactifs : souches lyophilisés de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei*. Sondes apolaires et sondes polaires : chloroforme (Carlo Erba, 438601), acétate d'éthyle (Sigma-Aldrich, 270989), dichlorométhane (Carlo Erba, 463311), toluène (Carlo Erba, 488555). Matériel nécessaire à l'élaboration correcte de la colonne. SMS-IGC 2000 apparatus (Surface Measurement Systems Ltd., London, UK) équipé d'un Détecteur à Ionisation de Flamme.

Mode opératoire : préparer des lits bactériens homogènes de chaque souche. Les meilleurs paramètres pour la détermination de leurs propriétés physico-chimiques ont été : quantité de sondes injectées $\frac{P}{P_0}$ constante égale à 0,025, masse totale du mélange de 500 mg avec du Téflon, masse totale du mélange de 550 mg avec du Chromosorb, pas d'utilisation de supports de dilution.



Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

PARTIE III

Résultats Commentés



- III.1 - Caractérisation et dynamique de substances polymériques d'origine algale
 - III.1.1 - Caractérisation partielle de substances polymériques matricielles extraites de la macro-algue *Chaetomorpha aerea*
 - III.1.2 - Composition et dynamique des Substances Polymériques Extracellulaires dans la formation de biofilm benthique : impacts environnementaux au sein des vasières intertidales charentaises
- III.2 - Etude des propriétés de surface de micro-organismes dans l'élaboration de biofilms
 - III.2.1 - Préparations des cellules microbiennes
 - III.2.2 - Comparaison des différentes méthodes classiques d'analyse des propriétés globales de surface des micro-organismes modèles
 - III.2.3 - Détermination des propriétés de surface de micro-organismes par Chromatographie Gazeuse Inverse
 - III.2.4 - La Chromatographie Gazeuse Inverse : méthode alternative ou méthode complémentaire pour la mesure des propriétés de surface de micro-organismes ?

III. RESULTATS COMMENTES

III.1 CARACTERISATION ET DYNAMIQUE DE SUBSTANCES POLYMERIQUES D'ORIGINE ALGALE

III.1.1 Caractérisation partielle de substances polymériques matricielles extraites de la macro-algue *Chaetomorpha aerea*

L'étude bibliographique et les nombreux travaux des dernières décennies ont largement mis en évidence le besoin de valoriser la matière végétale, quelle soit naturelle ou sous forme de « déchets » industriels inusités. La surproduction de l'algue *Chaetomorpha aerea* au sein des bassins charentais est un exemple local flagrant de la gêne occasionnée par quelques organismes vivants envers certaines activités industrielles humaines. En effet, cette algue verte opportuniste est à l'origine de nombreuses détériorations des écosystèmes côtiers de la région et modifie cruellement le réseau trophique et les conditions environnementales des bassins d'ostréicultures oléronais (problème d'eutrophisation). Lors de forts développements, elles peuvent provoquer rapidement une stratification de l'oxygène et crée des zones anoxiques au sein des claires. Cette croissance anormale constitue ainsi une gêne importante pour les activités en marais salés de la région Poitou-Charentes. Cette activité concerne potentiellement un peu plus de 1000 entreprises établies sur environ 15000 ha de marais salés (Bouquet 2008). Dans ce sens, cette partie de l'étude, initialement visait à étudier la composition de l'algue verte *Chaetomorpha aerea* et sa capacité à excréter de possibles substances polymériques d'intérêt. En effet, Nirmal Kumar *et al.* (2010) ont montré que des macro-algues appartenant au genre *Chaetomorpha* étaient riches en polysaccharides (30 %), acides aminés (15 %), protéines (20 %), phénols et lipides (1 %).

Il est important de rappeler que cette étude préliminaire avait pour objectif initial de développer et tester l'efficacité de l'ensemble des protocoles décrits en partie II.1.

III.1.1.1 Conditions d'extraction et optimisation

Différentes conditions d'extraction ont été testées afin de collecter des fractions polymériques spécifiques selon leurs compositions et/ou leurs concentrations.

La concentration en algues au sein des réacteurs a été modifiée afin d'étudier l'influence de la biomasse sur les concentrations en biomolécules extraites, tout en essayant de s'affranchir de problèmes diffusionnels couramment rencontrés en industries agro-alimentaires lors de procédés d'extraction.

III.1.1.1.1 Quantités de macro-algues

Afin de s'affranchir des problèmes diffusionnels couramment rencontrés lors de l'extraction de biopolymères à partir de matières premières végétales, différentes concentrations de macro-algues ont été utilisées (12, 25, 50 et 100 g/L). L'obtention d'une agitation régulière et suffisante ainsi que les rendements en polysaccharides et protéines après extraction ont permis de déterminer la concentration optimale permettant d'éviter ces problèmes diffusionnels. Les résultats obtenus sont présentés en Figure III.1-1. Dans un premier temps, on constate que des concentrations de 12 g/L et 25 g/L de macro-algues permettent d'extraire la totalité des polysaccharides et protéines extracellulaires, à l'instar de concentrations plus élevées. Ces résultats sont d'ailleurs cohérents avec les problèmes diffusionnels qui ont été observés dans les réacteurs pour des concentrations en macro-algues de 50 et 100 g/L. Finalement, la concentration de 25 g/L permet d'accéder, en quantités plus importantes, à la totalité des polymères extracellulaires de la macro-algue.

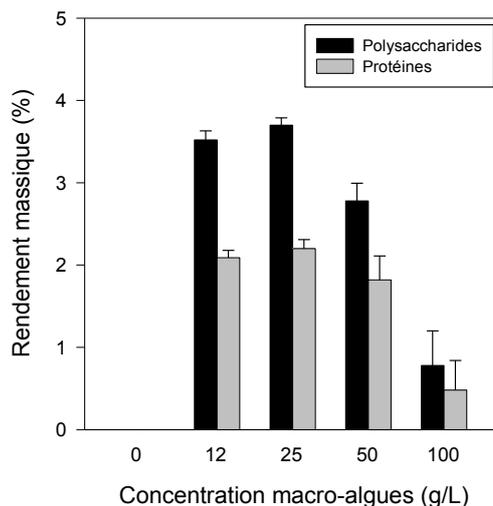


Figure III.1-1 : Influence de la concentration en macro-algues sur les rendements d'extraction des polysaccharides et protéines extracellulaires. Conditions d'étude suivantes : température d'extraction de 40°C, durée d'extraction de 24 h, concentrations en macro-algues variables (12, 25, 50 et 100 g/L), eau comme solvant d'extraction.

III.1.1.1.2 Durée d'extraction

La durée de l'extraction a également été étudiée. Les résultats sont présentés en Figure III.1-2. On constate ainsi que les quantités maximales de polysaccharides et protéines extracellulaires extraites sont atteintes au bout de 24 h. Au-delà, les quantités n'évoluent plus, indiquant ainsi que les polymères extracellulaires ont été extraits en totalité. Une lecture rapide des vitesses d'extraction à chaque temps semble indiquer que les vitesses d'extraction des polymères sont relativement constantes entre 0 et 24 h et optimales jusqu'aux alentours de 20 h (synonyme de l'entrée de pallier).

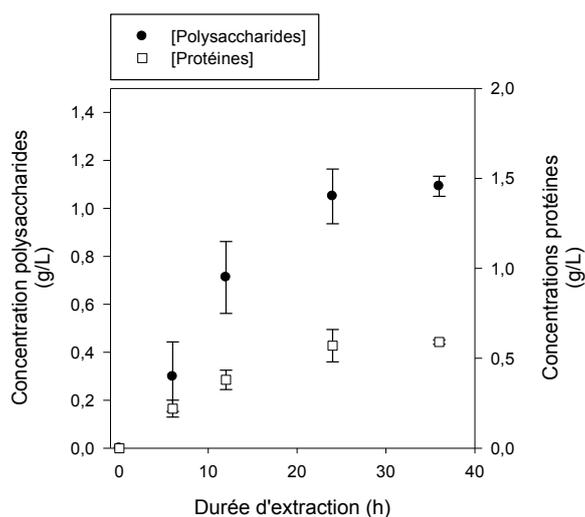


Figure III.1-2 : Influence de la durée d'extraction sur les quantités de polysaccharides et protéines extracellulaires extractibles. Conditions d'étude suivantes : température d'extraction de 40°C, durées d'extraction variables (0, 6, 12, 24, 36, 48 h), concentration en macro-algues de 25 g/L, eau comme solvant d'extraction.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-1

- *Détermination des conditions optimales d'extraction des SPE de *Chaetomorpha aerea*.*
- *Solvant d'extraction : Eau chaude (40°C) (Ruiz 2005).*
- *Concentrations en algues : 25 g/L.*
- *Durée d'extraction : 24 h sous agitation (450 rpm).*

III.1.1.2 Caractérisation de la fraction saccharidique

L'étude menée sur la valorisation des polymères extracellulaires de *Chaetomorpha aerea* s'est uniquement concentrée sur la fraction polysaccharidique, fraction majoritairement extractible au sein des échantillons traités. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que des polysaccharides d'origine algale présentaient, de part leurs compositions spécifiques, des propriétés gélifiantes et texturantes (Mc Hugh 2003), nutritives (Zemke-White & Ohno 1999) ou encore médicales (Boisson-Vidal *et al.* 2007 ; Nakajima *et al.* 2009).

III.1.1.2.1 Rendements d'extraction et compositions globales

Différents dosages colorimétriques couplés à de l'analyse chromatographique (CLHP et CPG/SM) ont permis de caractériser la structure primaire des fractions polysaccharidiques extraites. A partir d'un échantillon aqueux naturel de *Chaetomorpha aerea* (CHAET#0), différentes fractions plus ou moins riches en polysaccharides ont été récupérées. La fraction CHAET#1 a été obtenue après une première phase d'extraction et de purification (*cf.* II.1.2.1, p. 114-116). La fraction CHAET#2 a quant à elle été obtenue après dialyse (seuil de coupure 6-8 kDa) de la fraction CHAET#1. Les rendements d'extraction de chacune des fractions sont présentés dans la Figure III.1-3. A partir de 5000 mg de *Chaetomorpha aerea* (CHAET#0), 684 mg de la fraction CHAET#1 (13,7 % de rendement) et 233 mg de la fraction CHAET#2 (4,67 % de rendement) ont été collectés.

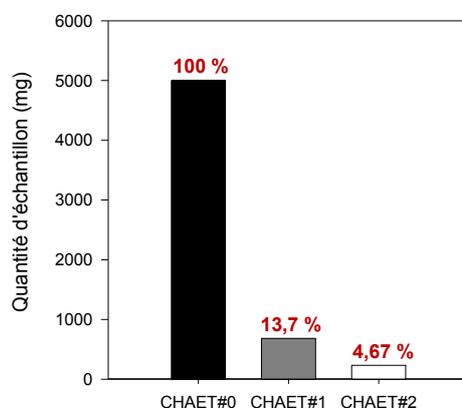


Figure III.1-3 : Rendements d'extraction des fractions CHAET#1 et CHAET#2 enrichies en polysaccharides.

Le Tableau III.1-1 présente la composition globale de chacune des fractions déterminée par différents dosages colorimétriques. Dans un premier temps, on constate une cohérence entre la composition de chaque fraction et la quantité des polymères analysés. 5000 mg de la fraction CHAET#1 contiennent 191 mg de polysaccharides (3,82 % m/m), tout comme les 684 mg de la fraction CHAET#1 contenant 192 mg de sucres (28,1 % m/m) ou les 233 mg de la fraction CHAET#2 contenant 178 mg de polysaccharides (76,6 % m/m). Les mêmes résultats ont été observés pour les quantités de protéines ou de sulfates. Les méthodes de purification successives permettent donc d'enrichir les fractions en polymères sans perte majeure (composition et quantité inchangées). Dans un deuxième temps, on remarque que la fraction finale CHAET#2 ne contient pas exclusivement des polysaccharides, malgré le protocole d'extraction et de purification utilisé. Riche en polysaccharides (76,6 % m/m), elle contient aussi des protéines (17,3 %). Cette observation est intéressante et explique le rendement d'extraction de 4,67 % de la fraction CHAET#2. Ces résultats sont cohérents avec des travaux menés sur d'autres macro-algues vertes de la même famille, comme *Chaetomorpha linum* (Percival 1979). Enfin, la fraction CHAET#2 présente des quantités importantes de sulfates (6,3 %). De précédentes études ont montré que les polysaccharides extraits de macro-algues du genre *Chaetomorpha* présentaient des degrés de sulfatation importants et complexes (Percival 1967, Percival 1979).

Tableau III.1-1 : Composition globale (rendement massique) de l'échantillon naturel CHAET#0 et des fractions CHAET#1, CHAET#2 enrichies en polysaccharides.

Composition (rendement massique %)	Polysaccharides	Acides uroniques	Protéines	Sulfates	Autres
CHAET#0	3,82 ± 0,12	nd	2,30 ± 0,11	0,33 ± 0,14	93,9
CHAET#1	28,1 ± 2,31	nd	6,53 ± 1,08	2,21 ± 0,92	71,9
CHAET#2	76,6 ± 0,62	nd	17,3 ± 2,85	6,3 ± 1,2	5,8

nd : non déterminé

III.1.1.2.2 Profil saccharidique de la fraction CHAET#2

Percival (1979) et d'autres auteurs plus récents ont mis en évidence la présence de polysaccharides majeurs au sein de macro-algues du genre *Chaetomorpha*. L'auteur a mis en évidence la présence de xyloarabinogalactanes sulfatés au sein de *Chaetomorpha linum*. Afin de déterminer les types et familles de polysaccharides présents au sein de la fraction CHAET#2, des analyses par CHLP via l'utilisation d'une colonne de gel filtration ont été menées (Figure III.1-4).

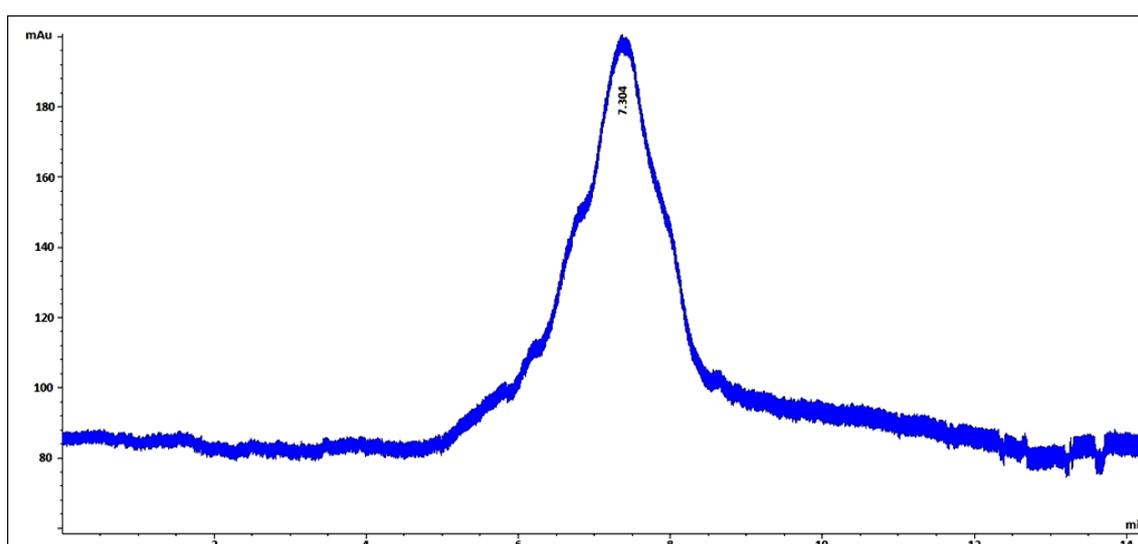


Figure III.1-4 : Détermination du poids moléculaire du polymère composant la fraction CHAET #2 par CLHP. Conditions d'étude II.1.4.5.1.

Les résultats ont mis en évidence la présence d'un pic unique d'intensité moyenne aux alentours de 7,3 min. L'utilisation de standards saccharidiques (II.1-16) a permis de déterminer le poids moléculaire de cette famille : à savoir $1,160.10^6 \pm 0,150.10^6$ Da. Le même pic et le même poids moléculaire ont été déterminés pour la fraction CHAET#1 (avant la dialyse à un seuil de coupure de 6-8 kDa). La fraction saccharidique extraite de *Chaetomorpha aerea* semble donc être constituée, soit d'une même famille de polysaccharides, soit d'un polysaccharide unique de haut poids moléculaire.

Afin d'étudier le profil saccharidique et protéique du polymère CHAET#2, des études par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ont été menées. Le spectre infrarouge obtenu pour CHAET#2 est présenté en Figure III.1-5.

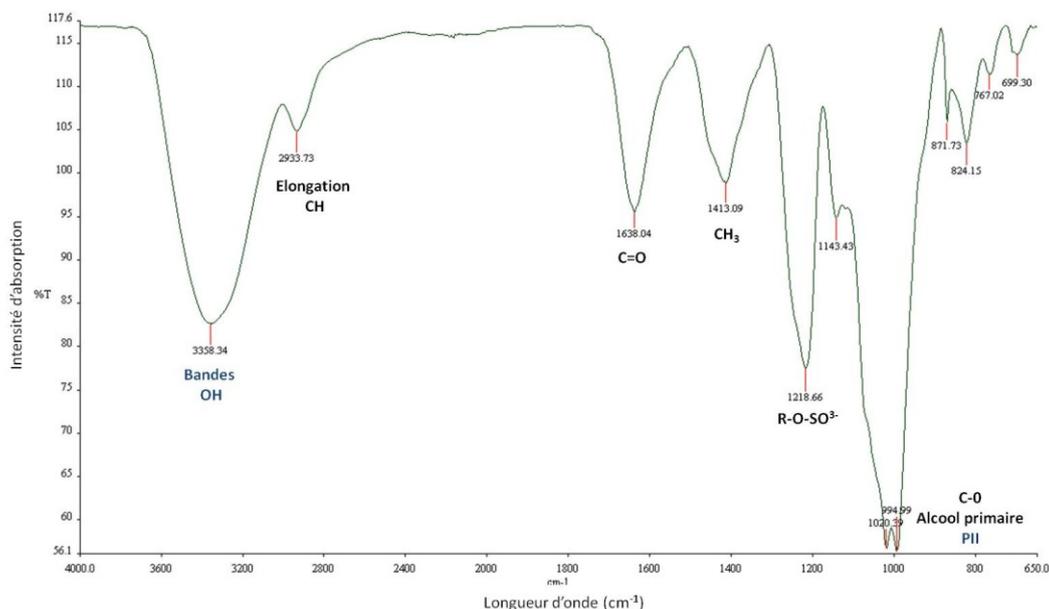


Figure III.1-5 : Spectre infrarouge de la fraction CHAET#2 enrichie en polysaccharides.

Plusieurs bandes majoritaires d'absorption sont visibles : autour de 3358 cm^{-1} (combinaison des bandes OH et NH), 2933 cm^{-1} (élongation CH), 1638 cm^{-1} (C=O, élongation des protéines notamment, connues comme amide I : AmI), 1413 cm^{-1} (groupement CH_3), 1218 cm^{-1} (R-O-SO_3^-) et 1020 cm^{-1} (C-O des alcools primaires et PII : modes de vibration complexe des polysaccharides). Les bandes observées sont cohérentes avec la composition globale de la fraction CHAET#2 déterminée précédemment (Tableau III.1-1). Une analyse en composante principale (Figure III.1-6) a permis de situer le spectre infrarouge du polymère CHAET#2 parmi plusieurs spectres de polysaccharides commerciaux : le dextrane, le sulfate de dextrane, le fucogel et le fucoïdane. Dans un premier temps, on constate que la protéine d'albumine de sérum bovin est bien séparée des polysaccharides. Les sucres à base d'acides uroniques, comme l'acide glucuronique ou le fucogel, de structure $3)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-GalpA-(1}\rightarrow$, sont également correctement séparés des polysaccharides riches en sucres neutres.

Le spectre du polymère CHAET#2 est regroupé autour des spectres de polysaccharides neutres (dextrane) et de polysaccharides complexes et sulfatés (sulfate de dextrane, fucoidane). CHAET#2 présente donc un spectre infrarouge proche des spectres de polysaccharides sulfatés commerciaux.

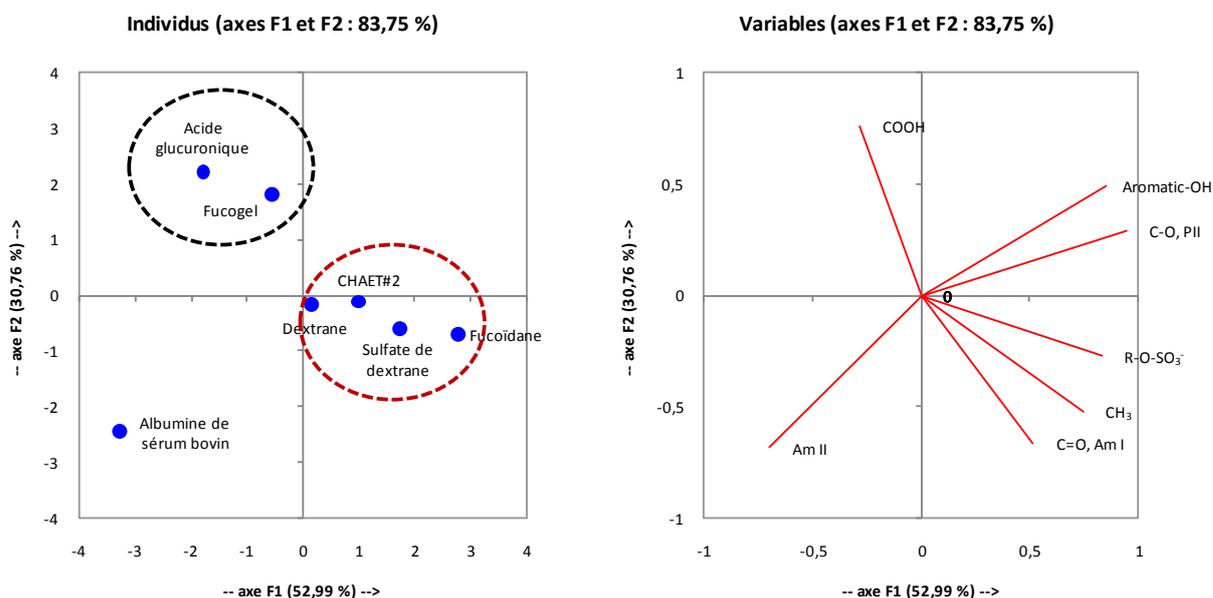


Figure III.1-6 : Analyse en Composante Principale (XLStat) des spectres infrarouges de la fraction CHAET#2 et de plusieurs standards polysaccharidiques et protéiques. Région spectrale (cm^{-1}) sélectionnée pour l'ACP de 650 à 4000 cm^{-1} .

III.1.1.2.3 Composition saccharidique de la fraction CHAET#2

L'identification et la quantification des monosaccharides de la fraction CHAET#2 a été réalisée via CLHP et CPG/SM par comparaison et analyse des profils chromatographiques de la fraction avec les profils chromatographiques de différents standards saccharidiques (Figures II.1-17 et II.1-19). Le spectre CHLP du polymère hydrolysé¹ CHAET#2 met en évidence trois pics majoritaires, à savoir le glucose, le galactose et l'arabinose (Figure III.1-7).

¹ L'hydrolyse totale des échantillons a été confirmée préalablement par CCM et analyses par DNS, qui ont par ailleurs mis en évidence le caractère réducteur des monomères présents au sein des échantillons totalement hydrolysés.

Cette identification a été confirmée par CPG/SM via la comparaison des spectres massiques de chaque pic avec les standards appropriés. Il est important de noter que des traces de xylose ont été détectées par CPG/SM sans être quantifiables (Tableau III.1-2).

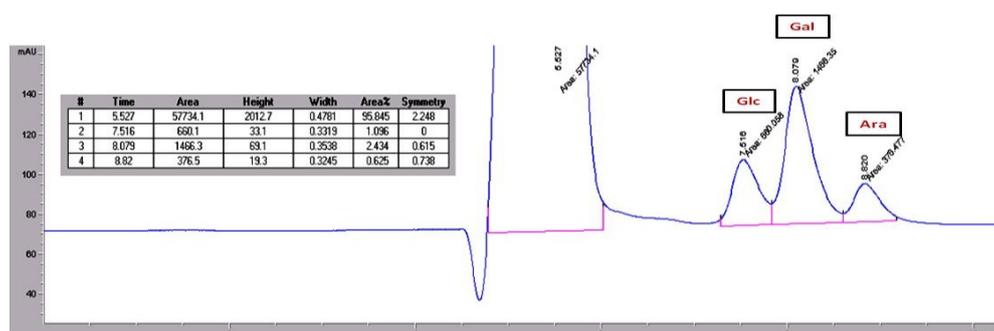


Figure III.1-7 : Monosaccharides identifiés et quantifiés au sein de la fraction CHAET#2 par CLHP. Conditions d'étude II.1.4.5.2.

Tableau III.1-2 : Identification et quantification des monosaccharides composant la fraction CHAET #2 par CPG/SM. Conditions d'étude II.1.4.6.

Monosaccharides	Temps rétention Standards	Temps rétention CHAET #2	Homologie des spectres SM (%)	Concentration massique (% m/m)
Rhamnose	6,49	-	-	-
Arabinose	6,61	6,59	93,45	17,9
Fucose	7,65	-	-	-
Xylose	8,59	9,11	91,87	trace
Mannose	10,72	-	-	-
Galactose	11,73	11,72	98,12	58,3
Glucose	12,67	12,59	98,89	23,8
Inositol	23,89	-	-	-

Après quantification, le polymère CHAET#2 présente une fraction saccharidique (76,6 % m/m) composée par 58,3 % de galactose, 23,8 % de glucose, 17,9 % d'arabinose et des traces de xylose. Cette composition est cohérente avec de nombreux travaux qui ont montré la prédominance de polysaccharides matriciaux (SPE) de type xyloarabinogalactane (sulfaté) au sein des algues vertes, notamment chez des macro-algues du genre *Chaetomorpha* (Percival 1979). Venkata Rao & Sri Ramana (1991) ont ainsi purifié et identifié un polysaccharide riche en arabinose (57 %), galactose (38,5 %), rhamnose (3,8 %) et sulfates (11,9 %) chez la macro-algue verte *Chaetomorpha antennina*.

De manière générale, les xyloarabinogalactanes (solubles dans l'eau) extraits de Chlorophycées sont des hétéropolysaccharides ramifiés et sulfatés, qui présentent des compositions variées, sans unité répétitive, si ce n'est des portions de (1,4)-L-arabinose, séparées par des unités de D-galactose (Percival 1979). Ces dernières, ainsi que les unités D-xylose sont généralement en position terminale.

L'ensemble des résultats obtenus sont donc cohérents avec la littérature des dernières décennies. La fraction CHAET#2 est composée d'un type de polymères d'un poids moléculaires d'environ 1.10^6 Da. Le polymère est constitué de 76,6 % de sucres, 17,3 % de protéines et 6,3 % de sulfates.

Le profil spectral infrarouge du polymère se classe parmi des polysaccharides commerciaux sulfatés comme le sulfate de dextrane. CHAET#2 est probablement un polysaccharide riche en galactose (xyloarabinogalactane) dont la fraction saccharidique est composée par des proportions en galactose/glucose/arabinose/xylose de 5,8/2,4/1,8/trace.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-2

- *Fraction CHAET#2 d'environ 1.10^6 Da.*
- *76,6 % de sucres, 17,3 % de protéines, 6,3 % de sulfates.*
- *Profil spectral infrarouge proche du sulfate de dextrane.*
- *Composition osidique :
galactose/glucose/arabinose/xylose 5,8/2,4/1,8/trace.*
- *Xyloarabinogalactane.*
- *Groupements sulfatés probablement situés sur les unités de galactose (Percival 1979).*

III.1.1.3 Activité antimicrobienne des extraits

La composition globale très particulière de la fraction CHAET#2 pourrait lui conférer des propriétés actives notables. Certains protéoarabinogalactanes collectés à partir du mucilage de cactées (genre *Platyopuntia*) ont ainsi montré une capacité importante de rétention des graisses (Malainine 2007). Anand Ganesh *et al.* (2009) ont également mis en évidence la présence d'un polymère similaire à l'héparine au sein de la macro-algue *Chaetomorpha antennina*. En outre, de nombreuses études se sont intéressées aux propriétés nutritives ou antimicrobiennes de xyloarabinogalactanes sulfatés (Percival 1979), arabinoxylooligosaccharides (Genestie 2006), arabinogalactanes (Brudieux 2007) ou plus généralement de galactanes sulfatés. L'utilisation de molécules marines dans des domaines variés (médecine, assainissement, agro-alimentaire) est d'ailleurs de première actualité comme le montre de nombreux travaux visant à valoriser des algues marines (Zheng *et al.* 2000 ; Al-Haj *et al.* 2009 ; Anand Ganesh *et al.* 2009 ; Kolanjinathan *et al.* 2009).

Afin d'évaluer une éventuelle activité biologique de l'extrait CHAET#2, des tests d'activité antibactérienne et antifongique ont été menés par diffusion radiale de l'extrait sur milieux gélosés. Les sensibilités de différentes souches à CHAET#2 ont été testées, à savoir *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (CIP 103214) et *Candida glabrata* (DSM 6425). Il est important de noter que l'extrait de CHAET#2 a été préalablement resuspendu, à hauteur de 50 g/L (Zheng *et al.* 2001), dans différents solvants (eau, méthanol, diméthylsulfoxyde, éthanol et acétone) présentant des polarités très variées.

Les résultats des tests n'ont montré aucune activité des différents extraits sur les souches *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Candida glabrata*. A l'inverse, la souche de *Staphylococcus aureus* semble sensible à CHAET#2. Des halos d'inhibition significatifs ont ainsi été observés (Figure III.1-8).

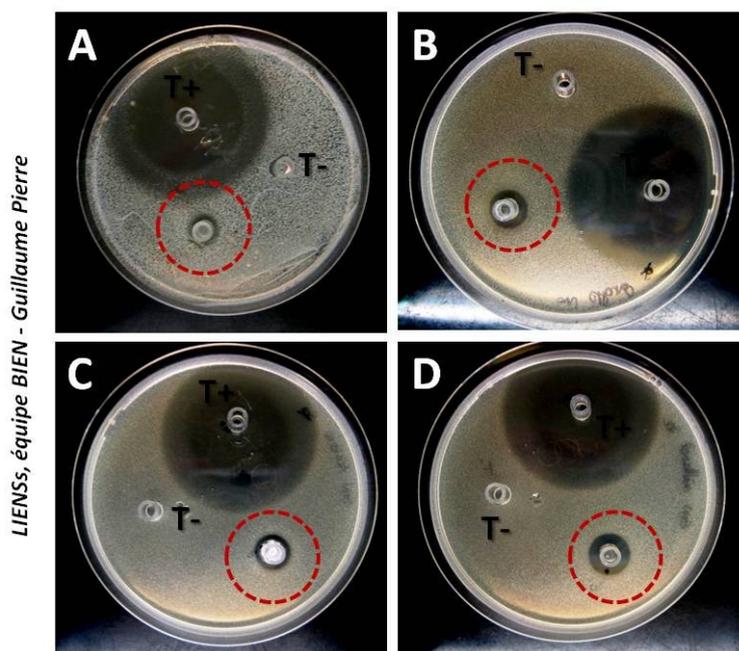


Figure III.1-8 : Sensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), après 24 h à 37°C, face à différents extraits de CHAET#2 resuspendus, à hauteur de 50 g/L, dans (A) de l'eau, (B) de l'éthanol absolu, (C) de l'acétone et (D) du méthanol. Les tests (B), (C) et (D) ont été réalisés sur gélose GN. Le test (A) a été réalisé sur gélose MH. T- représente un témoin négatif réalisé avec le solvant adapté à l'extrait resuspendu testé. T+ représente un témoin positif représentatif de la sensibilité de la souche (ampicilline).

On constate ainsi que toutes les fractions présentent une activité antibactérienne significative face à la souche testée. Cette activité semble légèrement plus importante au sein d'échantillons resuspendus dans du méthanol. Le Tableau III.1-3 présente les diamètres d'inhibition mesurés pour chaque extrait. L'activité anti-*Staphylococcus aureus* est du même ordre de grandeur au sein des cinq échantillons. Le méthanol semble toutefois être le solvant de prédilection pour resuspendre CHAET#2. Cette observation est d'ailleurs cohérente avec de nombreuses publications qui utilisent le méthanol (souvent dilué) ou l'eau pour resuspendre les extraits testés (Roger 2002, Ruiz 2005, Al-Haj *et al.* 2009). Les tailles des diamètres sont intéressantes et cohérentes avec des mesures réalisées sur la même souche bactérienne à partir d'extraits polymériques (50 g/L) de Chlorophytes (Zheng *et al.* 2001).

Tableau III.1-3 : Activité anti-*Staphylococcus aureus* du polymère CHAET#2 extrait de la macro-algue *Chaetomorpha aerea*.

Extrait (50g/L)	Activité anti- <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	
	Diamètre d'inhibition (mm)	
CHAET#2-Eau	10 ± 0,2	
CHAET#2-Ethanol	11 ± 0,4	
CHAET#2-Acétone	12 ± 0,1	
CHAET#2-Méthanol	11 ± 0,2	
CHAET#2-Diméthylsulfoxyde	10 ± 0,3	

Toutefois, la concentration testée au cours de cette étude ne reflète pas véritablement l'efficacité de l'extrait. C'est pourquoi des tests supplémentaires ont été menés afin de déterminer la CMI/CMB des extraits aqueux et méthanoliques de CHAET#2, toujours face à la même souche de *Staphylococcus aureus*. Plusieurs concentrations ont été testées, allant de 2 à 50 g/L. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III.1-4.

Tableau III.1-4 : Troubles bactériens de la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) visible après 24 h de culture à 37°C en présence de différentes concentrations d'extraits de CHAET#2, préalablement dilué dans de l'eau ou du méthanol.

Concentrations des extraits (g/L)	2	4	8	10	15	20	30	35	40	42	45	50
CHAET#2-Eau	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
CHAET#2-Méthanol	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

+++ : trouble bactérien important, + : trouble bactérien léger
++ : trouble bactérien moyen, - : aucune culture visible

On observe un trouble bactérien de la souche *Staphylococcus aureus* dans l'ensemble des tubes de concentrations comprises de 2 à 40 g/L. Le trouble devient moins intense à des concentrations croissantes importantes (35 g/L) et disparaît totalement à partir de 42 g/L. On peut donc considérer que la concentration minimale des deux extraits pour inhiber toute culture visible de la souche est de 42 g/L. Il est important de noter que ces CMI sont élevées et traduisent directement la faible efficacité de l'extrait face à la souche. Des dénombrements sur gélose des suspensions bactériennes en présence de 42 et 45 g/L d'extraits ont permis de déterminer la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) des échantillons testés.

Moins de dix colonies ont été dénombrées sur les géloses ensemencées à partir des suspensions bactériennes en contact avec une concentration de 45 g/L. 45 g/L est donc la CMB des deux échantillons. Le rapport CMB/CMI indique par ailleurs que les extraits présentent une activité bactéricide (CMB/CMI < 4).

De manière générale, le polymère CHAET#2 présente une activité bactéricide face à la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Cependant, l'obtention de cette activité nécessite l'utilisation de concentrations très importantes de l'extrait (45 g/L) traduisant directement sa faible efficacité.

Comparativement à d'autres biomolécules actives ou d'antibiotiques courants, comme l'ampicilline, le polymère CHAET#2 ne présente que peu d'intérêts en tant qu'agent désinfectant ou antibiotique.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-3

- *Activité antimicrobienne sélective de Staphylococcus aureus (ATCC 25923).*
- *Activité bactéricide (45 g/L) peu intense.*
- *Peu d'intérêt d'un point de vue antimicrobien.*

III.1.2 Composition et dynamique des Substances Polymériques Extracellulaires dans la formation de biofilms benthiques : impacts environnementaux au sein des vasières intertidales charentaises

Les biofilms benthiques, qui se développent au cours des périodes d'émersion des vasières intertidales, sont étudiés pour diverses raisons. Si l'on considère une perspective écologique, la raison principale de ces études est la compréhension de l'influence des biofilms benthiques au sein des écosystèmes intertidaux, en analysant leur composition et les changements qui s'opèrent selon les conditions environnementales. Durant les dernières décennies, de nombreuses études ont tenté de déterminer leur composition et ont mis en évidence la présence de micro-algues (microphytobenthos), de bactéries et de champignons, tous enchevêtrés au sein d'une matrice complexe de composés polymériques produits par ces différents organismes (Frølund *et al.* 1996). Ces Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) sont riches en polysaccharides, protéines, protéoglycanes, lipides et autres composés, tous exprimés à des concentrations spécifiques (Stoodley *et al.* 2002 ; Stal 2003) en fonction de la localisation et des conditions environnementales, affectant à la fois le réseau trophique et la productivité primaire de l'écosystème (Underwood & Paterson 2003). Les SPE sont impliquées dans la motilité des diatomées épipéliques¹ (Stal & Défarge 2005) et peuvent être utilisées comme sources carbonées par les communautés bactériennes (van Duyl *et al.* 1999 ; Hofmann *et al.* 2009). Les SPE peuvent également affecter le microenvironnement des biofilms en faisant varier des paramètres physico-chimiques comme la porosité ou la stabilité mécanique du sédiment (Orvain *et al.* 2003 ; Perkins *et al.* 2004 ; Spears *et al.* 2008). D'un autre côté, les SPE benthiques peuvent présenter des structures et fonctions intéressantes, qui peuvent être utilisées dans divers domaines biochimiques. L'extraction de polysaccharides sulfatés pour des applications médicales en est un exemple (Witvrouw & De Clercq 1997). De nombreux travaux ont déjà proposé des protocoles d'extraction permettant de collecter des SPE spécifiques (Staats *et al.* 1999 ; de Brouwer & Stal 2001 ; Azerado *et al.* 2003 ; Bellingier *et al.* 2005 ; Comte *et al.* 2006). Toutefois, ces données ont à chaque fois été critiquées et les auteurs s'accordent sur le fait qu'il n'existe pas de méthode universelle pour l'extraction des SPE benthiques (de Brouwer & Stal 2004). Ainsi, les méthodes de séparation et d'extraction doivent être sélectives du composé à extraire tout en contrôlant le devenir des autres composés.

¹ Diatomées capables de migrer à la surface du sédiment pour réaliser leur photosynthèse.

Une lyse cellulaire minimale et une altération ou détérioration des SPE quasi nulles sont indispensables à la bonne analyse de ces composés (Denkhaus *et al.* 2007).

Dans ce sens, Takahashi *et al.* (2009) a clairement démontré que l'extraction de SPE colloïdales et capsulaires, à l'aide d'une résine échangeuse de cations, était la meilleure méthode pour obtenir des rendements élevés en glucides totaux et permettre une extraction optimale sans lyse cellulaire ni contamination par le matériel polymérique interne aux cellules (glucides de stockage notamment, type glucane et chrysolaminarane). Selon le protocole d'extraction utilisé, il est ainsi possible de distinguer différents types de SPE, en fonction de leurs compositions, structures et localisations au sein du sédiment. Le protocole de Takahashi *et al.* (2009) permet la collecte de trois fractions majoritaires (Figure II.1-3) :

- les fractions riches en SPE colloïdales, correspondant aux substances polymériques excrétées dans le milieu extracellulaire,
- les fractions riches en SPE capsulaires, composés entourant les cellules, probablement impliquées dans des phénomènes de protection et/ou d'adhésion cellulaire,
- les fractions résiduelles, contenant à la fois des polymères internes (stockage de glucides chez les diatomées) et des SPE capsulaires réfractaires n'ayant pas été extraites par la résine échangeuse d'ions.

En outre, ce protocole d'extraction permet la séparation de chaque catégorie de SPE en deux types, Bas et Haut Poids Moléculaire (BPM, HPM), grâce à l'utilisation d'éthanol à froid (Bellinger *et al.* 2005).

Cette partie s'est articulée autour de l'étude des SPE excrétées durant le développement d'un biofilm microphytobenthique issu d'un sédiment intertidal de la région de Marennes-Oléron, France (Figure II.1-1). Cette étude *in situ* novatrice a été menée via l'utilisation du protocole d'extraction développée par Takahashi *et al.* (2009) afin de mieux caractériser les SPE produites par ce microphytobenthos dominé par des diatomées épipéliques (Orvain *et al.* 2003 ; Haubois 2005 ; Herlory 2005), durant trois périodes consécutives d'émergence diurne courant février 2008. Le principal but de cette partie était de déterminer et comprendre via des analyses biochimiques variées, les dynamiques de production de SPE au cours du développement d'un biofilm microphytobenthique.

Par ailleurs, une connaissance plus juste de ces dynamiques pourrait significativement permettre une meilleure compréhension du réseau trophique local ainsi que de l'influence physico-chimique de ces SPE sur l'écosystème côtier charentais voire sur des écosystèmes côtiers européens similaires.

III.1.2.1 Normalisation et analyses statistiques des résultats

III.1.2.1.1 Normalisation par les concentrations en chlorophylle *a* du sédiment

Pour chacune des fractions étudiées, les quantités de glucides totaux, acides uroniques, protéines et groupements sulfatés ont été normalisées par les concentrations en chlorophylle *a* mesurées durant les mêmes périodes d'émersion du sédiment. Cette normalisation, classiquement utilisée dans la littérature, surestime légèrement la production de SPE par les diatomées benthiques et permet ainsi de s'affranchir partiellement des contaminations polymériques produites par d'autres sources. On considère d'ailleurs que cette surestimation s'approche toutefois de l'écosystème local puisque les biofilms microphytobenthiques de la région charentaise sont dominés par des diatomées épipéliques (Haubois *et al.* 2004).

III.1.2.1.2 Analyses statistiques des résultats

Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) a été utilisée pour analyser des modifications significatives des quantités en glucides et acides uroniques en fonction de paramètres abiotiques (localisation du prélèvement, durée d'émersion) et ce pour chaque jour. Une transformation des données (racine) a été réalisée à chaque fois qu'il était nécessaire de vérifier les conditions d'application. Les tests de normalité des résidus ont été effectués par la méthode de Kolmogorov-Smirnov et les tests d'homoscédasticité par les tests de Bartlett. Par ailleurs, des analyses post-hoc (test de tukey) ont permis d'analyser des données deux à deux. L'utilisation des corrélations de Pearson a permis d'étudier la relation des différentes SPE avec plusieurs paramètres biotiques (densité bactérienne, concentration en chlorophylle *a*) et abiotiques (luminosité). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées via le logiciel de statistiques XLStat (Addinsoft).

III.1.2.2 Validation de l'étude et limitations méthodologiques

La dynamique de production de SPE durant la formation *in situ* d'un biofilm microphytobenthique a été étudiée au cours de ce travail novateur. Les conditions d'application de l'étude ont dans un premier temps été vérifiées afin de s'assurer de la justesse de l'étude. Il est apparu pertinent d'articuler cette démarche autour des contextes d'application de l'étude, tout en s'intéressant de manière critique aux limitations méthodologiques des protocoles utilisés :

- contexte majeur : formation d'un biofilm microphytobenthique,
- contexte mineur : cohérence des résultats avec la littérature,
- limitation majeure : méthode de prélèvements et d'extractions,
- limitation mineure : contamination des SPE par d'autres sources primaires ou secondaires.

III.1.2.2.1 Contexte majeur : la formation d'un biofilm microphytobenthique

Ainsi, la luminosité durant la campagne était suffisante à la photosynthèse des diatomées épipéliques (Figure III.1-9, A). Les mesures de luminosité ont été les plus importantes le premier jour de prélèvements ($1000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Les autres pics maximaux de luminosité ont été mesurés entre 12 h et 14 h pour les deux derniers jours de prélèvements (de 600 à $800 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). La comparaison entre la luminosité observée durant la campagne et les concentrations en SPE mesurées *in situ* n'a pas révélé d'impact négatif significatif de la luminosité ambiante sur la dynamique de production de ces mêmes SPE ($r = -0.444$, $R^2 = 0,197$). De manière générale, la dynamique de production de SPE par les diatomées d'un biofilm benthique au cours de périodes d'émersion est affectée par des rythmes endogènes, le niveau de luminosité et les conditions nutritionnelles du milieu (Underwood & Paterson 2003 ; Hanlon *et al.* 2006). Le contexte de l'étude, à savoir la formation et le développement d'un biofilm microphytobenthique a été confirmé (Figure III.1-9, B). Deux étapes ont été observées durant la formation du biofilm (Rincé *et al.* 1999). La première (du 18/02/08 au 20/02/08) correspond à la période de constitution du biofilm, indirectement visible par la stagnation des concentrations en chlorophylle *a* ($23 \mu\text{g/g}$ de sédiment sec) et donc de la biomasse micro-algale (Figure III.1-9, B ●), période au cours de laquelle les SPE sont prioritairement produites (Orvain *et al.* 2003).

A partir du 21/02/08, la deuxième phase du développement du biofilm débute, caractérisée par une augmentation significative de l'activité photosynthétique (p value [5%] = 0,003) due à l'augmentation de la biomasse micro-algale et visible dans les 2 premiers mm du sédiment grâce à des profils micro-échelles¹ (Figure III.1-9, B □).

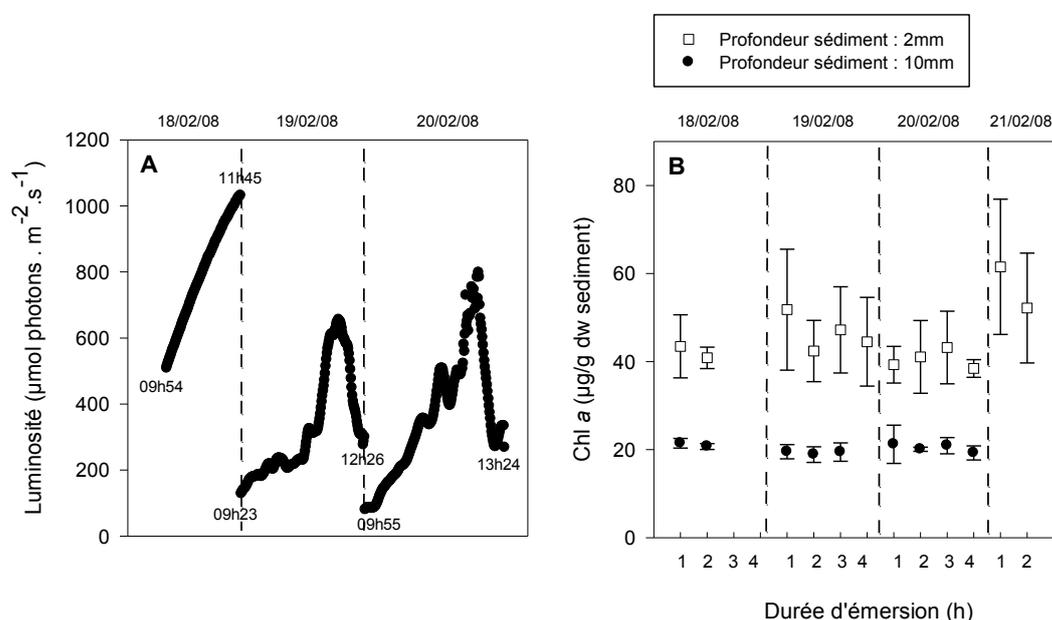


Figure III.1-9 : Evolution des concentrations en chl a au cours de marées diurnes (A) dans les premiers 2 millimètres (B) et 10 millimètres (C) du sédiment.

III.1.2.2.2 Limitation majeure : les dix premiers mm de sédiment

De manière générale, les résultats obtenus montrent qu'un gramme de sédiment sec, collecté à n'importe quel endroit du sédiment intertidal étudié, est composé d'environ 1600 à 1900 µg de glucides totaux et d'environ 300 à 600 µg de protéines (Tableau III.1-5). Bien qu'une partie du sédiment n'ait pas été biochimiquement déterminée, de nombreux auteurs considèrent que des échantillons de sédiments intertidaux naturels peuvent contenir une quantité importante de molécules (lipides, acides nucléiques) et d'impuretés (sels) (de Brouwer *et al.* 2001 ; Underwood & Paterson 2003). En outre, il a été montré que la méthode d'analyses biochimiques des glucides totaux (Dubois 1956) ne permettait pas la quantification totale de polysaccharides complexes, générant ainsi de fréquentes sous-estimations des quantités totales réelles de polysaccharides au sein du sédiment (Hofmann *et al.* 2009).

¹ Modulation par amplitude d'impulsion (MAP). Les deux premiers mm du sédiment représentent plus fidèlement le microphytobenthos.

Tableau III.1-5 Composition partielle ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sédiment sec) du sédiment des vasières intertidales de Marennes-Oléron. Seuls les sucres neutres, acides uroniques, groupements sulfates et protéines ont été analysés et séparés en fonction de leurs fractions d'origine après extraction.

Fractions	Glucides neutres	Acides uroniques	Groupements sulfates ¹	Protéines
BPM Colloïdales	59 ± 8	23 ± 9	0	0
HPM Colloïdales	57 ± 16	7 ± 2	0	0
BPM Capsulaires	76 ± 8	22 ± 10	0	0
HPM Capsulaires	11 ± 2	4 ± 2	0	0
BPM Résiduelles	413 ± 79	112 ± 38	0	180 ± 72
HPM Résiduelles	530 ± 155	304 ± 172	204 ± 66	203 ± 55

± : les valeurs et écarts-types ont été calculés à partir de l'hétérogénéité de la station de prélèvements (trois quadrats) et non à partir des triplicatas des différentes analyses biochimiques (<5%). Les valeurs ne tiennent pas compte de la durée d'émersion du sédiment.

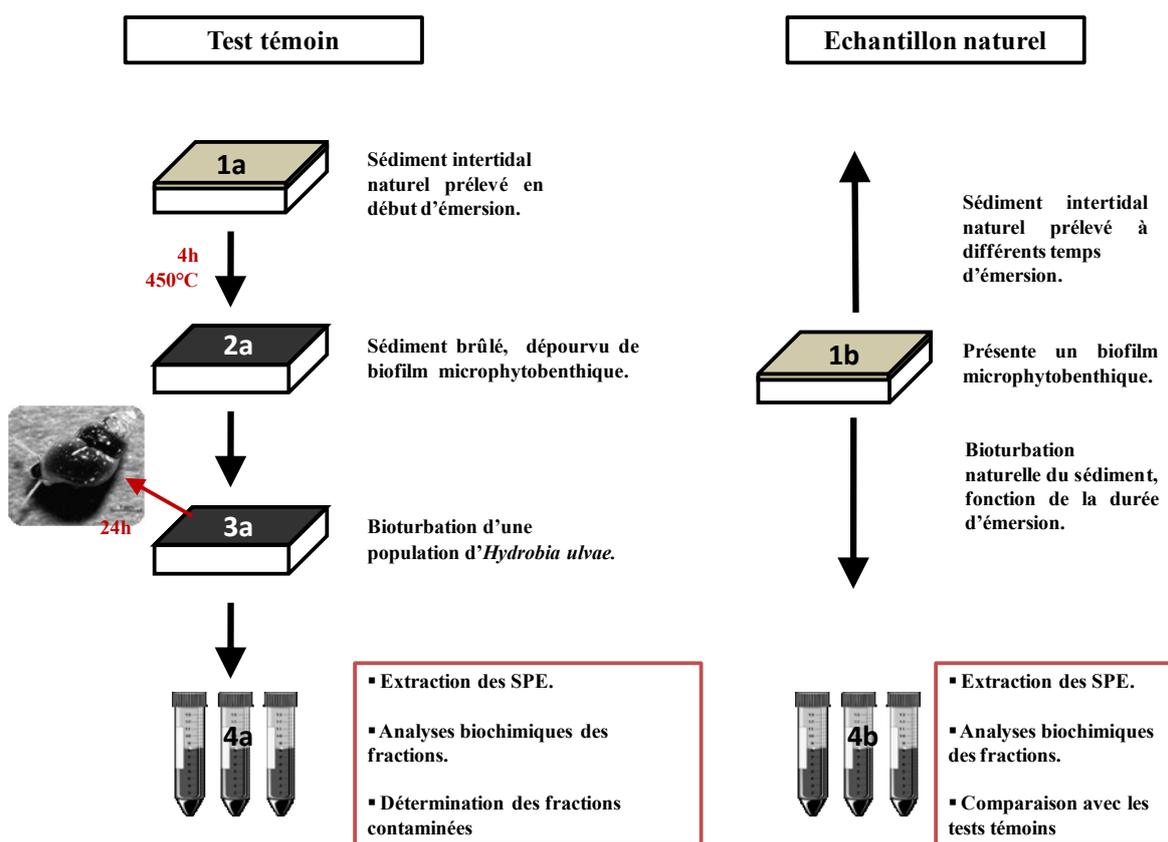
III.1.2.2.3 Limitation mineure : sources multiples de SPE dans le sédiment, un facteur possible de contamination

Les gastéropodes du genre *Hydrobia* sont connus comme étant des producteurs majeurs de mucus polymériques au sein du sédiment intertidal, en particulier dans le premier centimètre, lieu de consommation des hydrobies. Compte tenu de son importance dans la possible surestimation des SPE produites par les algues microphytobenthiques, la présence du gastéropode *Hydrobia ulvae* (*Gastropoda*, *Hypsogastropoda*, *Hydrobiidae*, *Hydrobia*) a été surveillée au cours du développement du biofilm microphytobenthique (Figure III.1-10). Une augmentation de la population des hydrobies (2000 individus.m⁻² passant à 10000 individus.m⁻²) a été observée durant la campagne de prélèvements (cf. 1b). Afin d'étudier l'impact du gastéropode sur la production d'autres SPE, un test témoin a été réalisé en laissant bioturber² pendant 24 heures (cf. 3a) des hydrobies sur un sédiment (cf. 1a) préalablement brûlé 4 heures à 450°C (cf. 2a) afin d'éliminer la présence d'un biofilm microphytobenthique. Après 24 heures, les SPE ont été extraites (cf. 4a, 4b) selon le même protocole d'extraction (cf. II.1.2.2, p. 117).

¹ Indique la quantité de groupements sulfates mesurée au sein des glucides totaux (sucres totaux et acides uroniques).

² Correspond à un remaniement du sédiment par les mouvements et le mode de nutrition de ce gastéropode.

Les résultats ont mis en évidence une augmentation significative des glucides totaux au sein des fractions HPM capsulaires. Ainsi, on peut considérer que ces hydrobies sont à l'origine d'une légère surestimation (de l'ordre de quelques μg) des SPE microphytobenthiques au sein des fractions HPM capsulaires. La présence de ce mucus d'hydrobies est toutefois suspectée d'apporter aux fractions HPM capsulaires une composition biochimique plus complexe, notamment dans la répartition des monosaccharides, en comparaison avec de précédentes études (Bellinger *et al.* 2009).



*Figure III.1-10 : Schéma explicatif des tests témoins visant à partiellement définir l'influence du gastéropode *Hydrobia ulvae* dans la surestimation des quantités de SPE microphytobenthiques du sédiment intertidal charentais.*

III.1.2.2.4 Contexte mineur : cohérence des résultats

Les fractions colloïdales, riches en glucides, sont composées à la fois de SPE de Bas et Haut Poids Moléculaire (proche de 50 %) (Tableau III.1-6). La quantité totale de glucides colloïdaux (sucres neutres et acides uroniques), soit 146 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment (Tableau III.1-5), correspond aux données communes décrites dans la littérature : à savoir 50 à 5000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment, la valeur la plus haute ayant été mesurée dans une zone tropicale (Underwood & Paterson 2003).

Tableau III.1-6 : Distribution en glucides des différentes fractions extraites de SPE.

% (m/m)	Ratio des fractions	Bas Poids Moléculaire	Haut Poids Moléculaire
Glucides Colloïdaux	9	56	44
Glucides Capsulaires	7	87	13
Glucides Résiduels	84	39	61
Glucides Totaux	100*	43	57

* (1618 μg glucides/g de sédiment sec)

Nonobstant cette relative correspondance, les quantités de glucides colloïdaux mesurées *in situ* au sein des vasières de Marennes-Oléron ont été comparées à des quantités calculées à partir du modèle mathématique d'Underwood & Smith (1998). Ce modèle mathématique ($R^2 = 64,6 \%$) permet de corrélérer la quantité de glucides colloïdaux et la quantité de chlorophylle *a* au sein de n'importe quelle vasière intertidale européenne dominée par des diatomées épipéliques.

$$\text{Équation III.1-1} \quad \log (CGC + 1) = 1,40 + 1,02 \times \log (CCA + 1)$$

où *CGC* correspond au Contenu Glucidique Colloïdal et *CCA* le Contenu en Chlorophylle *a* mesuré *in situ*. *CGC* et *CCA* doivent obligatoirement être exprimés dans les mêmes unités.

Le modèle a ainsi été appliqué aux concentrations moyennes en chlorophylle *a* mesurées *in situ* (21,5 $\mu\text{g chl } a.\text{g}^{-1}$ de sédiment sec) pendant la campagne de prélèvement. La résolution du deuxième membre de l'équation a permis d'obtenir une valeur proche de 2,78. Considérant les valeurs mesurées *in situ* de 146 μg de glucides colloïdaux par gramme de sédiment, la résolution du premier membre du modèle a permis d'obtenir une valeur de 2,15.

Eu égard au modèle mathématique utilisé et à son facteur de corrélation, il a été conclu que les concentrations en glucides colloïdaux mesurées *in situ* au cours de cette étude correspondaient bien à des valeurs classiques obtenues pour des vasières intertidales européennes dominées par des diatomées épipéliques.

Les fractions capsulaires sont composées de glucides principalement de BPM (Tableau III.1-6). La quantité de glucides capsulaires ($\pm 113 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sédiment) est relativement proche de celle quantifiée pour les glucides colloïdaux, laissant supposer que ces glucides soient présents équitablement au sein de cet écosystème benthique. Toutefois, les quantités de glucides capsulaires mesurées au cours de cette étude sont inférieures à celles couramment citées dans la littérature pour des vasières européennes. D'après les travaux de Takahashi *et al.* (2009), l'utilisation d'un nouveau protocole d'extraction *in situ* est à l'origine de cette différence significative. L'utilisation d'une résine cationique permet d'extraire plus spécifiquement les SPE capsulaires, évitant ainsi de contaminer ces fractions par des substances polymériques internes aux cellules (par lyse cellulaire notamment). Cette conclusion est d'autant plus avérée qu'aucune protéine n'a été retrouvée dans ces fractions, à l'inverse de nombreuses études précédentes (de Brouwer *et al.* 2001 ; Underwood & Paterson 2003 ; Hanlon *et al.* 2006 ; Hofmann *et al.* 2009). On peut d'ailleurs noter que, d'après ces observations, le protocole de Takahashi *et al.* (2009) pourrait permettre de vérifier *in situ* la véracité d'un processus biologique¹ particulier suspecté par plusieurs auteurs (Staats *et al.* 2000 ; Orvain *et al.* 2003) : la capacité des SPE a réajusté l'équilibre interne cellulaire afin de garder un ratio sucres/protéines constant au cours de phases de stress, essentiellement nutritif.

Enfin, les fractions résiduelles ont été plus largement extraites que les fractions contenant des SPE (Tableau III.1-6). Elles présentent une composition plus complexe via la présence de protéines (22 %) et de composés sulfatés (15 % des glucides résiduels totaux) (Tableau III.1-5). Les polymères résiduels, détectés dans ces fractions, sont comparables aux polymères intracellulaires des diatomées épipéliques (glucanes, chrysolaminaranes) et à des polymères associés aux parois cellulaires. En outre, ces fractions peuvent contenir quelques SPE capsulaires réfractaires à l'extraction par la résine échangeuse de cations (Takahashi *et al.* 2009).

¹ Un métabolisme d'overflow dans ce cas particulier.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-4

- *Contexte de formation d'un microphytobenthos confirmé.*
- *Etude sur les dix premiers mm du sédiment.*
- *Contamination des SPE possible par d'autres sources (Hydrobia).*
- *Cohérence des résultats avec la littérature :
Concentrations in situ validées par le modèle prédictif
d'Underwood & Smith (1998).*
- *Protocole d'extraction validée pour des études in situ.*

III.1.2.3 Dynamique de production de SPE durant la formation d'un biofilm microphytobenthique

III.1.2.3.1 Les SPE colloïdales et capsulaires

III.1.2.3.1.1 Glucides totaux

Les résultats obtenus sont présentés en Figure III.1-11. Les fractions colloïdales (cf. A) présentent des profils relativement similaires : les quantités totales de glucides colloïdaux (BPM + HPM) sont en moyenne proche de $6,5 \mu\text{g de sucres} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$. Des différences de concentrations ont été observées en fonction du lieu de prélèvement (traduites par les écart-types), s'avérant toutefois non significatives (p value [5%] = 0,970 and 0,121 pour les glucides colloïdaux de HPM et BPM respectivement). Les résultats montrent que les quantités de sucres colloïdaux de BPM restent constantes aux alentours de $3,5 \mu\text{g de sucres} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$ pendant la campagne de prélèvements (à l'exception du point 20/02/08-4h, avec une concentration proche de $5,5 \mu\text{g de sucres} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$). Les quantités de sucres totaux de HPM sont, quant à elles, légèrement plus faibles ($3 \mu\text{g de sucres} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$ avec une augmentation au point 20/02/08-4 à $5 \mu\text{g de sucres} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$).

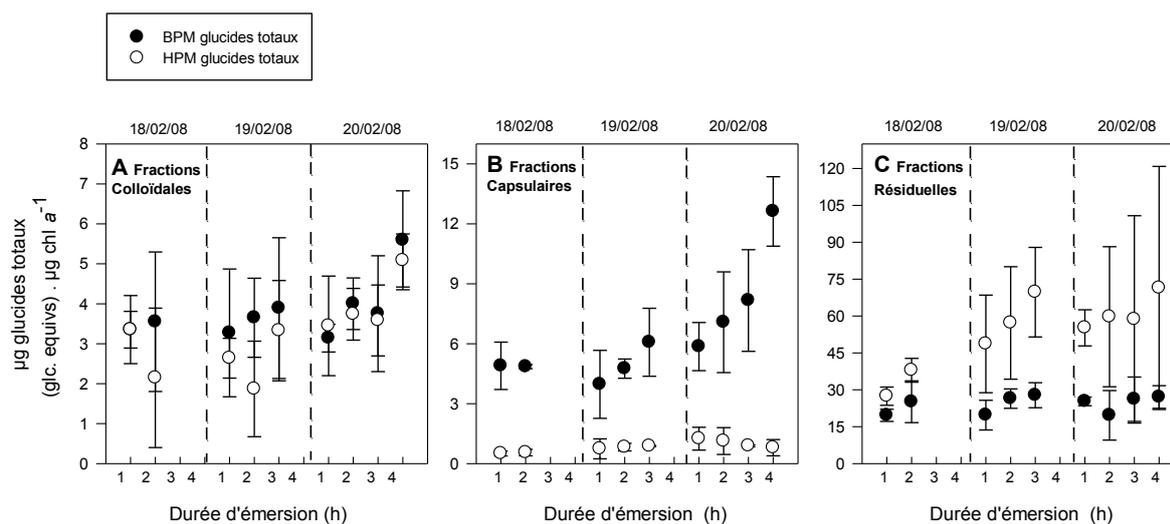


Figure III.1-11 : Dynamiques de production des glucides totaux ($\mu\text{g glc eqivs.}\mu\text{g chl a}^{-1}$) extraits des fractions colloïdales (A), capsulaires (B) et résiduelles (C) au cours de l'émersion du sédiment.

Aucun effet significatif du jour de prélèvement n'a été observé sur la dynamique de production des glucides colloïdaux de BPM et HPM (p value [5%] = 0,447 et 0,471). Par ailleurs, les variations en glucides colloïdaux de HPM (p value des jours 2/18-19-20/08 [5%] = 0,425, 0,196 et 0,409 réciproquement) et BPM (p value des jours 2/18-19-20/08 [5%] = 0,281, 0,345 et 0,0138 réciproquement) ne suivent pas de tendance particulière au cours des périodes d'émersion contrairement aux résultats obtenus par Taylor *et al.* (1999). L'auteur avait observé une augmentation des concentrations en glucides colloïdaux en fin de période d'émersion, c'est-à-dire lorsque les diatomées épipéliques commençaient à migrer à l'intérieur du sédiment en prévision de la période d'immersion. Il a été supposé que cette différence provenait essentiellement de la méthode d'extraction des SPE colloïdales. En effet, l'auteur avait travaillé à partir de SPE colloïdales contaminées par des polymères internes, la méthode d'extraction étant incriminée puisqu'elle nécessitait l'emploi de sédiments congelés et lyophilisés. Or de nombreux auteurs ont mis en évidence le caractère destructeur d'une congélation suivie d'une lyophilisation pour des cellules micro-algales. Wigglesworth-Cooksey *et al.* (2001) ont ainsi indirectement démontré que la lyophilisation (impliquant une congélation préalable) de cultures de diatomées était à l'origine d'une lyse cellulaire importante puisque l'auteur était alors capable de mesurer des quantités de polymères jusqu'à cinquante fois supérieures à celles obtenues à partir de cultures fraîches (Tableau III.1-7).

Si l'on considère la méthode utilisée par Taylor *et al.* (1999), il est donc difficile de déterminer si les auteurs ont observé une augmentation réelle des glucides colloïdaux en fin d'émersion ou une augmentation des quantités de polymères internes. Cette dernière hypothèse est d'ailleurs la plus probable puisque les diatomées épipéliques ont tendance à stocker un maximum de matières polymériques, le plus souvent au niveau de leurs vacuoles sous la forme de structures carbonées, afin d'assurer leur devenir métabolique au cours de l'immersion du sédiment (phase d'obscurité).

Tableau III.1-7 : Analyse d'extraits à partir de cellules de diatomées fraîches et lyophilisées, d'après Wigglesworth-Cooksey *et al.* (2001).

Analyse	Culture d' <i>Amphora coffeaeformis</i> ^a		Culture de <i>Navicula sp.</i> ^a	
	Fraîche	Lyophilisée	Fraîche	Lyophilisée
Glucides totaux	3,6	68,8	1,6	82,7
Protéines	24,0	135,0	1,4	168,3

^ales quantités sont données en $\mu\text{g.mg}^{-1}$ de poids sec cellulaire

Concernant les fractions capsulaires (Figure III.1-11, B), les analyses statistiques ont montré que les dynamiques de production des glucides de BPM et HPM variaient en fonction du jour de prélèvement (p value [5%] = 0,001 et 0,023 respectivement). Par ailleurs, aucun effet significatif concernant l'influence de l'hétérogénéité spatiale n'a été trouvé (p value [5%] = 0,957 et 0,324 respectivement). Les concentrations en sucres capsulaires de BPM ont tendance à augmenter au cours des phases d'émersion. Cette observation est d'autant plus prononcée et significative pour la période d'émersion du 20/02/08 puisque les quantités de sucres doublent (6 μg à 13 μg de sucres. $\mu\text{g chl a}^{-1}$) (p value pour le 20/02/08 [5%] = 0,028). A l'inverse, cette tendance n'est pas observable pour les glucides capsulaires de HPM (exemple de la p value du jour 18/02/08 [5%] = 0,488). On constate par ailleurs que les glucides capsulaires de HPM semblent être produits en petites quantités, de manière constante et uniforme, et ce peu importe la localisation du sédiment et sa durée d'émersion (0,8 à 1 μg de sucres. $\mu\text{g chl a}^{-1}$). Ces dynamiques de production sont cohérentes avec des résultats publiés par divers auteurs, mettant en évidence une augmentation des quantités de glucides colloïdaux et capsulaires à la surface de sédiments intertidaux européens au cours de phases d'émersion relativement prolongées (Smith & Underwood 1998 ; Taylor *et al.* 1999 ; Hanlon *et al.* 2006 ; Bellinger *et al.* 2009).

Enfin, on constate que les quantités de glucides colloïdaux totaux (Figure III.1-11, A) sont approximativement les mêmes que celles mesurées pour les glucides capsulaires totaux (cf. B) et sept fois inférieures à celles mesurées au sein des fractions résiduelles (cf. C).

III.1.2.3.1.2 Sucres neutres et acides uroniques

Les quantités d'acides uroniques ont été mesurées au sein des fractions colloïdales et capsulaires de BPM et HPM puis comparées à la quantité de glucides totaux des mêmes fractions (Figure III.1-12, A, B). On constate que les quantités d'acides uroniques colloïdaux représentent une part plus importante des glucides colloïdaux totaux de BPM ($\pm 21\%$) que pour les glucides colloïdaux totaux de HPM ($\pm 10.5\%$). Cette observation est cohérente avec les travaux de nombreux auteurs qui ont montré que les acides uroniques constituaient une partie importante des glucides colloïdaux de BPM (Underwood *et al.* 1995 ; Hanlon *et al.* 2006).

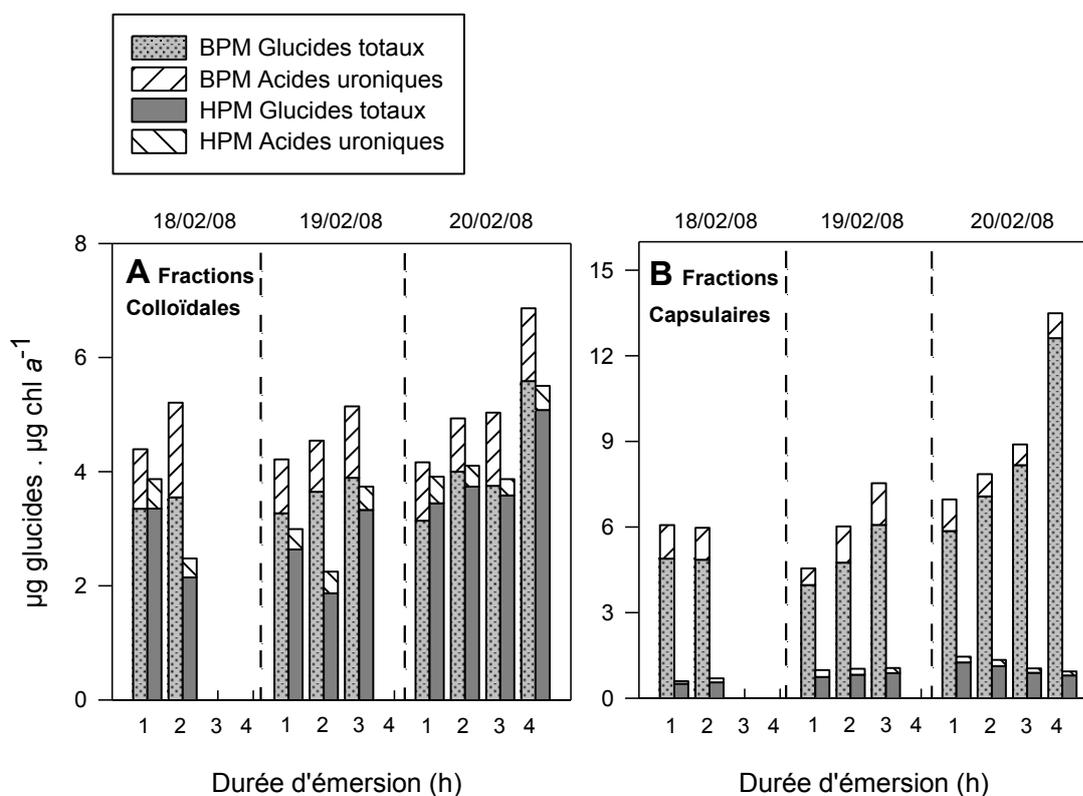


Figure III.1-12 : Comparaison quantitative entre acides uroniques et sucres neutres des fractions glucidiques totales ($\mu\text{g glc equivs.}\mu\text{g chl a}^{-1}$), et ce pour les fractions colloïdales (A) et capsulaires (B) en fonction des périodes d'émersion.

De manière générale, les quantités d'acides uroniques colloïdaux de BPM restent fixes pendant les périodes d'émergence (de $\pm 20\%$ à $\pm 22\%$). A l'inverse, les quantités d'acides uroniques colloïdaux de HPM ont tendance à diminuer durant les phases d'émergence (de $\pm 12\%$ à $\pm 7.5\%$).

Concernant les acides uroniques mesurés au sein des fractions capsulaires de BPM et HPM (Figure III.1-12, B), on constate que leurs répartitions au sein des glucides capsulaires sont différentes de celles mesurées au sein des fractions colloïdales. Ainsi, les fractions glucidiques capsulaires de BPM et HPM contiennent respectivement 15% et 16% d'acides uroniques, ces répartitions ayant été définies comme significativement différentes par les analyses statistiques (p value [5%] $< 0,0001$).

Une différence significative a été observée entre les dynamiques de production des acides uroniques capsulaires de BPM et HPM (p value [5%] = $0,018$). On constate ainsi que la répartition des acides uroniques capsulaires au sein des glucides de BPM diminue durant l'émergence du sédiment, notamment pour le 20/02/08 en passant de 15% à 6% . Cette observation, particulière à ce jour de prélèvement, a été considérée comme non négligeable puisqu'un effet significatif du jour de prélèvement a été observé pour la dynamique des fractions de BPM (p value [5%] = $0,002$). Enfin, la répartition des acides uroniques au sein des fractions glucidiques capsulaires de HPM ne varie pas pendant les périodes d'émergence (18%).

III.1.2.3.1.3 Répartition BPM/HPM des glucides neutres et acides uroniques

Les distributions (% m/m) entre les glucides neutres de BPM et HPM ainsi qu'entre les acides uroniques de BPM et HPM sont présentées en Figure III.1-13 pour les fractions colloïdales (cf. A) et capsulaires (cf. B).

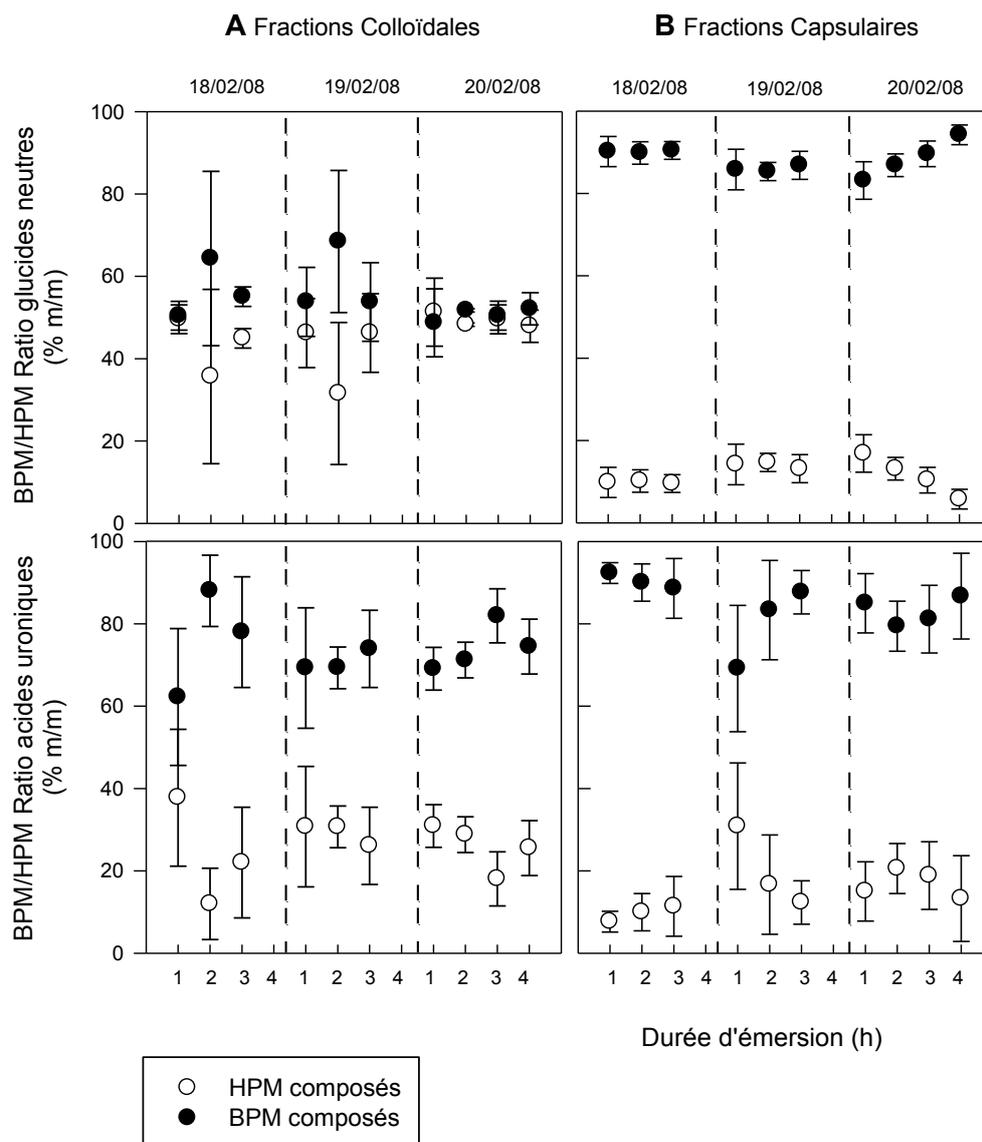


Figure III.1-13 : Distribution en BPM/HPM des glucides totaux et acides uroniques pour les fractions colloïdales (A) et capsulaires (B) au cours de l'émergence du sédiment.

Les glucides colloïdaux neutres de BPM et HPM, fractions significativement différentes (p value [5%] = 0,003), semblent être produits dans les mêmes proportions tout au long des périodes d'émergence même si les BPM restent légèrement plus abondants au sein du sédiment (Figure III.1-13, A). Une différence significative a également été observée entre les acides uroniques colloïdaux de BPM et HPM indiquant que ces fractions sont bien dissemblables de part leurs dynamiques de production. On constate ainsi que les acides uroniques colloïdaux de BPM sont plus abondants ($\pm 75\%$) tout au long des émergences du sédiment que ceux de HPM ($\pm 25\%$).

Concernant les fractions capsulaires, 90 % des glucides neutres sont de BPM et ce de manière extrêmement constante durant toutes les périodes d'émersion (Figure III.1-13, B). La même observation a été faite concernant les acides uroniques capsulaires de BPM. Ces fortes proportions en molécules de BPM sont surprenantes comparées aux données de la littérature ; elles pourraient être attribuées aux fortes propriétés acides intrinsèques de la résine cationique Dowex Marathon C utilisée. Cette dernière pourrait en effet être à l'origine d'une hydrolyse partielle de SPE de HPM, favorisant la surabondance de glucides capsulaires totaux de BPM.

III.1.2.3.1.4 L'importance des glucides dans la formation d'un biofilm microphytobenthique

Eu égard à la littérature des dernières décennies ayant longuement explicité le besoin de comprendre la nature physique et biochimique des SPE (notamment capsulaires), les précédentes observations permettent, pour la première fois *in situ*, d'essayer de corrélérer la composition glucidique de ces substances avec leur(s) capacité(s) à devenir une partie intégrante de la matrice des biofilms (Chiovitti *et al.* 2003a ; Abdullahi *et al.* 2006 ; Bellinger *et al.* 2009). En effet, les interactions cellule-cellule ou cellule-substrat sont facilitées par la production maîtrisée de glucides capsulaires (Wustman *et al.* 1997 ; Chiovitti *et al.* 2003a), grâce à la présence de sucres neutres et d'acides uroniques spécifiques (structure, poids moléculaire, fonction particulière). Les propriétés anioniques de ces fractions glucidiques, conférées notamment par la proportion d'acides uroniques, permettent des associations entre cations divalents, augmentant considérablement les forces de liaison intervenant au cours du développement d'un biofilm (Sutherland 2001) et permettant d'améliorer la stabilité des bio-processus mis en jeu (Bellinger *et al.* 2009). En outre, certaines études ont mis en évidence la capacité de ces SPE à améliorer l'incorporation d'eau au sein de la matrice du biofilm via la formation de liaisons hydrogènes spécifiques (Sutherland 2001).

Ainsi, la diminution du rapport acides uroniques capsulaires/sucres neutres capsulaires, observée précédemment en fin d'émersion, pourrait correspondre à une diminution relative de la stabilité du biofilm afin de permettre une resuspension partielle de matières organiques et carbonées dans la colonne d'eau au début de l'immersion du sédiment (à des fins trophiques par exemple).

La présence de protéines et de sucres complexes (sulfatés) pourrait par ailleurs avoir des influences directes sur la capacité de ces substances capsulaires à participer spécifiquement ou plus activement à la formation d'un biofilm microphytobenthique. Toutefois, ce postulat n'a pu être confirmé puisque ni protéines ni groupements sulfates n'ont été détectés au sein des fractions colloïdales et capsulaires.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-5

- *Pas d'évolution significative des SPE colloïdales.*
- *Répartition égale entre SPE colloïdales de BPM et HPM.*
- *Augmentation des quantités de SPE capsulaires pendant l'émergence du sédiment. Ces SPE pourraient jouer un rôle majeur dans les phénomènes de formation du biofilm (micro-organismes/sédiment).*
- *90 % des SPE sont de BPM. Les propriétés acides intrinsèques de la Dowex peuvent être responsables du phénomène.*
- *Evolution rapide des ratios sucres neutres/acides uroniques. Observation corrélée à de possibles diminutions de la stabilité du sédiment.*

III.1.2.3.2 Les substances et polymères résiduels

Les compositions des fractions résiduelles en glucides totaux et acides uroniques sont présentées en Figure III.1-14. Dans un premier temps, on constate une très bonne répétabilité spatiale des glucides résiduels totaux de BPM (cf. A), confirmée par l'étude statistique (aucune différence significative entre les différents lieux de prélèvement, p value [5%] = 0,556). Les concentrations en glucides résiduels totaux de BPM stagnent aux alentours de 20 μ g de sucres. μ g chl a^{-1} pendant toutes les phases d'émergence.

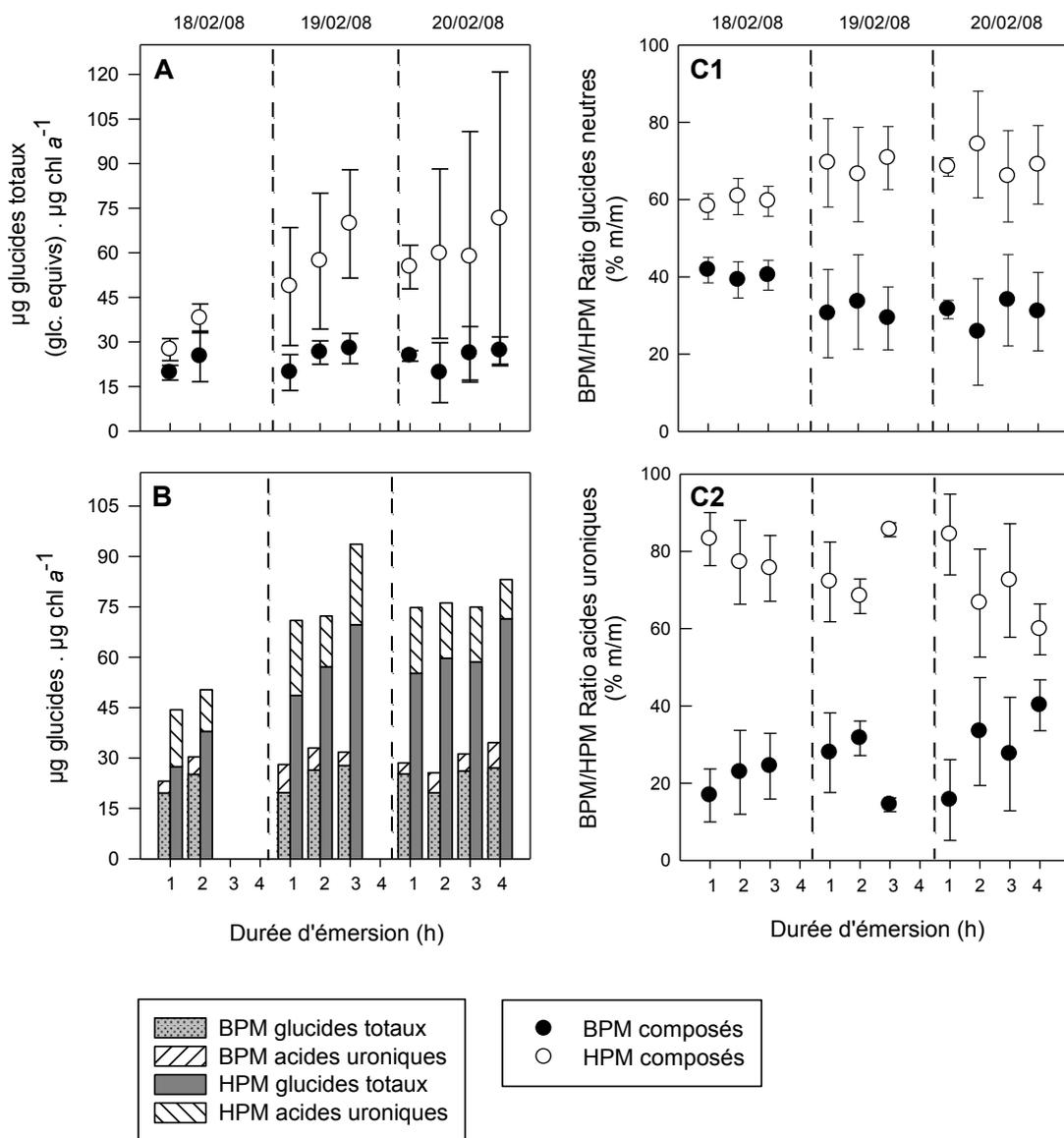


Figure III.1-14 : Compositions des fractions résiduelles en glucides totaux (A), acides uroniques (B) et distribution en BPM (C1) / HPM (C2) de ces sucres au cours de périodes d'émersion du sédiment.

D'un autre côté, les dynamiques de production des glucides résiduels totaux de HPM sont différentes. En effet, la disparité entre les différents quadras de prélèvements (visible par la lecture des écarts-types) n'est pas négligeable (p value [5%] = 0,002) bien qu'aucun effet de temporalité n'ait été observé (p value [5%] = 0,784). On constate que les quantités de glucides totaux résiduels de HPM augmentent (de 30 à 70 $\mu\text{g sucres} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$) sans pour autant corrélérer avec la durée des émerisions (p value des jours 18-20/02/08 [5%] = 0,576, 0,976 et 0,057 réciproquement). De manière générale, l'abondance en glucides totaux résiduels n'augmente pas au cours des émerisions, contrairement à de nombreux travaux.

En effet, il aurait semblé cohérent d'observer une augmentation significative des concentrations en glucides résiduels totaux en fin d'émersion, due à un stockage plus important de glucose sous la forme de polymères de stockage (glucanes, chrysolaminaranes) par les diatomées épipéliques du biofilm (Underwood *et al.* 2004). Ces polymères carbonés photoassimilés sont d'ailleurs par la suite utilisés comme sources énergétiques durant les périodes d'obscurité et les phases de stress nutritif par ces micro-organismes photosynthétiques.

D'un autre côté, on observe que les fractions glucidiques totales de BPM sont constituées d'environ 15% d'acides uroniques résiduels, proportion constante durant toutes les périodes étudiées (cf. B). Concernant les acides uroniques résiduels de HPM, on constate que leurs proportions sont plus importantes et varient de 21 à 27 % (voir jusqu'à 33 % le 19/02/08).

Enfin, les résultats présentés en Figure III.1-14, montrent que les fractions résiduelles sont essentiellement composées de molécules de HPM. 60 à 70 % des glucides totaux résiduels sont de HPM (cf. C1) tout comme 60 à 80 % d'acides uroniques résiduels (cf. C2). La distribution BPM/HPM des glucides résiduels totaux ne suit par ailleurs aucune tendance particulière contrairement à celles des acides uroniques où l'on constate une diminution des quantités d'acides uroniques résiduels de HPM au cours des émersion (82 à 78 % le 18/02/08, 72 à 68 % le 19/02/08 et 85 à 60 % le 20/02/08).

La présence de groupements sulfatés (8 à 14 μg sulfates. μg chl a^{-1}) et de protéines révèle par ailleurs la composition complexe de ces fractions résiduelles (Figure III.1-15).

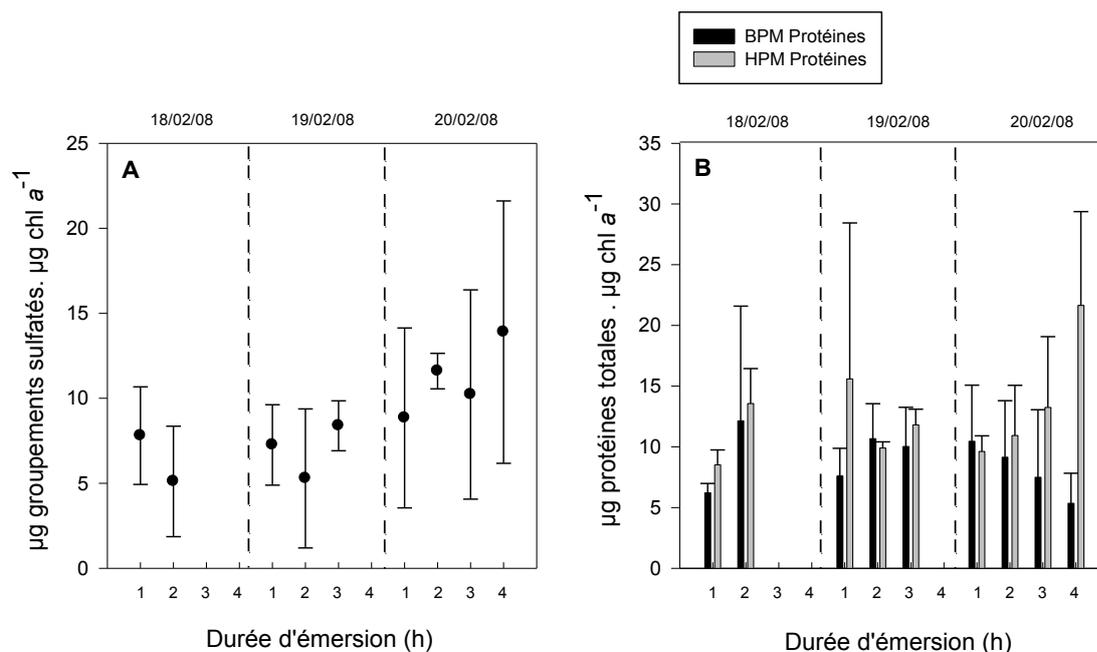


Figure III.1-15 : Complexité des fractions résiduelles HPM : évolution des concentrations en groupements sulfates (A) et des protéines (B) au sein du sédiment en fonction des périodes d'émersion.

Au sein des fractions résiduelles de BPM, on observe une relative stagnation des quantités de protéines aux alentours de 8 µg de protéines.µg chl a⁻¹ durant les périodes d'émersion, bien qu'une légère diminution soit constatée le 20/02/08 durant les quatre heures d'émersion du sédiment (de 11 à 6 µg de protéines.µg chl a⁻¹). Concernant les protéines résiduelles de HPM, on remarque une augmentation de leurs concentrations au cours de l'émersion (de 9 à 14 µg de protéines.µg chl a⁻¹ le 18/02/08 et de 9 à 22 µg de protéines.µg chl a⁻¹ le 20/02/08). Globalement, la présence de ces composés est cohérente avec de précédents travaux qui avaient mis en évidence la présence de protéines, en tant que composés carbonés additionnels de stockage ou de structuration (glycoprotéines) (Chiovitti *et al.* 2003b, Becker 2007, Bellinger *et al.* 2009; Takahashi *et al.* 2009). Néanmoins, il est important de noter que l'augmentation des concentrations en protéines résiduelles de HPM durant l'émersion du sédiment ne correspond pas avec une augmentation des glucides résiduels totaux (Figure III.1-14, A). Bien que l'exposition des vasières aux marées soit à l'origine de modifications physiques et chimiques rapides à la surface du sédiment (Christie *et al.* 2000), les résultats n'ont pas permis de corrélérer cette surproduction de protéines résiduelles avec une surproduction de glucides résiduels, synonyme d'un stockage accru de substances carbonées par les diatomées pour prévenir leurs besoins métaboliques durant les phases d'immersion.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-6

- *Fractions riches en polymères de réserve (type glucanes, chrysolaminaranes) de HPM.*
- *Fractions qui présentent encore une certaine quantité de SPE capsulaires réfractaires à l'extraction par la résine.*
- *Fractions complexes (protéines et sulfates). Composés qui pourraient servir de polymères additionnels de stockage.*

III.1.2.4 Distribution en monosaccharides des SPE

III.1.2.4.1 Distribution globale

Conformément aux travaux de Staats *et al.* (1999), les compositions en monosaccharides (Figure III.1-16) des fractions colloïdales (cf. A), capsulaires (cf. B) et résiduelles (cf. C) sont très hétérogènes. D'après les faibles écarts-types obtenus (<5 %) entre les différents lieux de prélèvements, on peut considérer que les types de monosaccharides, leurs turn-over et leurs quantités sont contrôlés à court terme durant les périodes d'émersion à n'importe quel endroit du sédiment, impliquant ainsi les conditions environnementales (facteurs biotiques et abiotiques), le phénomène d'érosion ou le cycle de transport et de dépôt de matières organiques (Underwood & Paterson 2003).

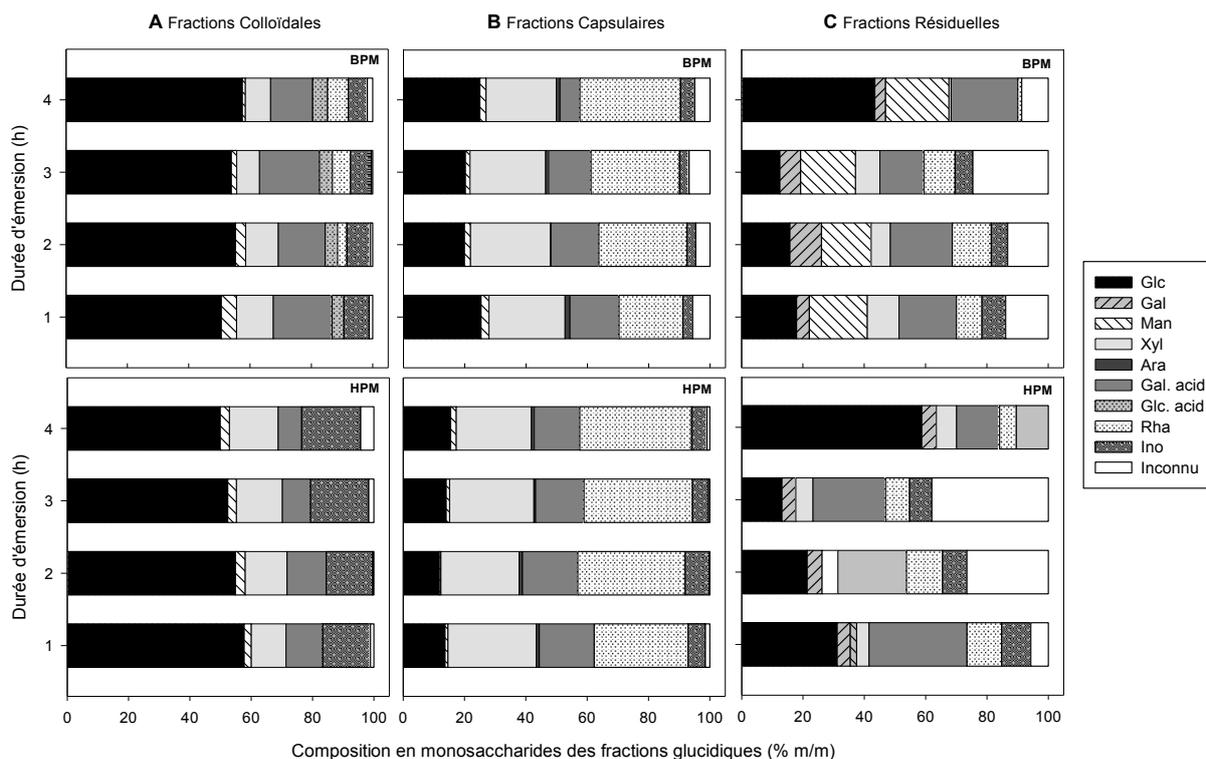


Figure III.1-16 : Compositions en monosaccharides (moyennées à partir des trois sites de prélèvements) des différentes fractions glucidiques extraites du sédiment à différents temps d'émergence. La répétabilité entre les triplicatas spatiaux est inférieure à 5%. L'inconnu indique la somme des traces n'ayant pu être identifiées.

Les fractions glucidiques colloïdales sont principalement composées de glucose, d'acide galacturonique, de xylose et d'inositol (cf. A). Les fractions glucidiques colloïdales de BPM contiennent ± 23 % d'acides uroniques (80 % d'acide galacturonique et 20 % d'acide glucuronique). Ces proportions confirment d'ailleurs les résultats obtenus par les dosages décrits précédemment. Les fractions glucidiques colloïdales de BPM contiennent plus de 50 % de glucose mais aussi 5 % de rhamnose, 10 % de xylose et 7 % d'inositol (*myo*-inositol).

Les fractions glucidiques capsulaires présentent, quant à elles, une distribution en monosaccharides plus équilibrée : essentiellement du rhamnose, du xylose, du glucose et de l'acide galacturonique (cf. B). Cette première observation contraste avec de précédents travaux qui avaient montré que les SPE capsulaires étaient riches en glucose.

Le protocole d'extraction utilisé a donc permis de minimiser les risques de lyses cellulaires et éviter de contaminer ces fractions très particulières par des polymères internes de stockage des diatomées. Les fractions glucidiques capsulaires de BPM sont riches en rhamnose (de 21 % à 32,9 % au cours des périodes d'émersion), xylose (\pm 24 %), glucose (\pm 21 %) et acide galacturonique (de 6,5 % à 16 %). De faibles quantités d'arabinose et mannose ont également été détectées. Les fractions glucidiques capsulaires de HPM sont, quant à elles, riches en rhamnose (35 %), xylose (25 %) et présentent une proportion en glucose plus faible que pour les fractions BPM (12-13 %). La proportion d'acide galacturonique reste constante durant les périodes d'émersion (16 %).

Enfin, les fractions glucidiques résiduelles présentent une composition en monosaccharides beaucoup plus complexe et difficile à analyser (inconnues importantes). Ces fractions sont riches en glucose, mannose, rhamnose, galactose et acide galacturonique (cf. C). Toutefois, on constate que les proportions de chaque monosaccharide varient de manière importante durant les périodes d'émersion, rendant délicate la détermination d'une composition typique.

III.1.2.4.2 Composition en glucides et relation avec le développement d'un biofilm benthique

Nous proposons pour cette partie de l'étude de comparer les résultats de composition décrits précédemment à de précédents travaux qui s'étaient intéressés à la caractérisation biochimique de différentes fractions de SPE : des fractions de SPE colloïdales, des extraits colloïdaux (cSPE), des fractions de SPE obtenues après extraction à l'eau chaude (HW¹) et des fractions de SPE récoltées après un traitement au bicarbonate chaud (HB²) (Abdullahi *et al.* 2006). Nous avons adapté nos résultats au modèle conceptuel d'Underwood & Paterson (2003) (cf. *Note 1*) afin de comparer correctement les différentes fractions.

¹ HW : Hot Water.

² HB : Hot Bicarbonate.

Nos fractions colloïdales de BPM (Figure III.1-16, A) peuvent être comparées aux exsudats de faibles poids moléculaires obtenus par Underwood & Paterson (2003), aux fractions colloïdales de Bellinger *et al.* (2009) ou de Hofmann *et al.* (2009). Au sein des vasières intertidales de Marennes-Oléron, les fractions glucidiques colloïdales de BPM sont composées de 53 % de glucose, 16 % d'acide galacturonique, 11 % de xylose et 8 % d'inositol. Il est intéressant de noter que les proportions en hexoses (xylose, mannose) diminuent durant les périodes d'émersion, laissant supposer que ces sucres sont plus facilement assimilés ou dégradés. Les quantités importantes de xylose ou de mannose laissent supposer que ces monosaccharides jouent un rôle important durant la formation du biofilm. Dans ce sens, certains auteurs ont montré que la présence de mannose au sein d'un polysaccharide particulier pouvait améliorer l'assimilation de protéines ou de molécules au sein de cellules (Hieber *et al.* 1976).

Nos fractions colloïdales de HPM (Figure III.1-16, A) sont comparables à la catégorie des SPE colloïdales (Underwood & Paterson 2003) et cSPE d'Abdullahi *et al.* (2006) ou d'Hofmann *et al.* (2009). Le contenu glucidique de ces fractions est principalement composé de glucose (55 %), inositol (15 %), xylose (12 %) et d'acide galacturonique (12 %). A l'inverse d'Abdullahi *et al.* (2006), les proportions de mannose sont infimes (3 %). La diminution de la proportion en acide galacturonique, visible dans toutes les fractions, peut être attribuée aux rôles des acides uroniques dans le processus de formation d'un biofilm microphytobenthique et de sa maintenance en modifiant la charge globale ou l'hydrophobicité de la matrice de SPE.

Nos fractions capsulaires de BPM (Figure III.1-16, B), obtenues *in situ* pour la première fois sans réelle contamination par des polymères internes, présentent des concentrations en glucose extrêmement faibles, en comparaison des fractions HPM d'Abdullahi *et al.* (2006) ou d'Hanlon *et al.* (2006). Le rhamnose (25 %), le xylose (22 %), le glucose (20 %) et l'acide galacturonique (13 %) constituent les monosaccharides principaux du contenu glucidique. La méthode d'extraction utilisée a donc permis de mettre en évidence l'importance des désoxy-sucres dans le contenu glucidique de ces fractions. En effet, on constate que la proportion en rhamnose augmente fortement pendant l'émersion, à l'inverse des proportions en acide galacturonique. Les proportions en xylose et glucose restent quant à elles stables.

De manière générale, les désoxy-sucres sont impliqués dans la biostabilisation du sédiment (Zhou *et al.* 1998, Giroldo *et al.* 2003) grâce à leurs propriétés de surface. Ils peuvent influencer le caractère hydrophobe des SPE et favoriser leurs adhésions au sein de la matrice du biofilm. Ils sont capables d'influencer directement des phénomènes tels que la dessiccation ou la salinité du sédiment en régulant l'incorporation d'eau à la surface du sédiment (Spears *et al.* 2008). Le rhamnose est par ailleurs un composant membranaire de certaines bactéries et peut également être spécifiquement identifié par des lectines, transmettant alors des signaux aux cellules et conférant des propriétés spécifiques de Quorum Sensing au sein d'un biofilm (rôle de senseur). En outre, le rhamnose peut également jouer un rôle de surfactant au sein de la matrice de SPE afin de permettre une meilleure adhésion entre diatomées épipéliques et bactéries. Globalement, ces fractions glucidiques capsulaires de BPM sont étroitement impliquées dans la formation de la matrice extracellulaire d'un biofilm microphytobenthique et permettent probablement de répondre à très court terme aux exigences des conditions environnementales (Underwood & Paterson 2003).

De la même façon, le contenu glucidique des fractions capsulaires de HPM (Figure III.1-16, B) est essentiellement composé de rhamnose (30 %), de xylose (28 %), d'acide galacturonique (18 %) et de glucose (13 %). Insolubles dans l'éthanol, la composition de ces glucides est relativement stable pendant l'émersion du sédiment.

Nos fractions résiduelles de BPM et HPM (Figure III.1-16, C) contiennent quant à elles des polymères de réserve ou associés aux parois cellulaires, ainsi que des SPE capsulaires réfractaires à l'extraction par la résine. Ces fractions sont comparables à une partie des fractions HW et à toutes les fractions HB d'Abdullahi *et al.* (2006) et Hanlon *et al.* (2006). Le contenu glucidique des fractions est composé de glucose (de 18 % à 43 %), d'acide galacturonique (19 %), de mannose (18 %), de xylose (10 %) et de rhamnose (10 %). Tout comme les travaux de nombreux auteurs, ces fractions sont extrêmement complexes en partie à cause de la présence de protéines, de groupements sulfatés. En outre, les monosaccharides détectés peuvent être impliqués dans la structure de polymères hétérogènes (glycolipides, protéoglycanes) (Mulloy 2005, Becker 2007). Il est toutefois important de noter que la proportion en glucose au sein du contenu glucidique est intéressante. On constate ainsi une diminution de cette proportion durant les premières heures de l'émersion, suivie d'une significative augmentation en fin d'émersion (les quantités doublent voire triplent).

Cette observation semble cohérente avec le métabolisme des diatomées et correspond aux résultats publiés par différents auteurs (Hanlon *et al.* 2006). Comme il l'a été explicité précédemment, les diatomées épipéliques stockent en fin d'émersion un maximum de substances carbonées pour migrer dans le sédiment et se préparer à survivre durant les périodes d'obscurité et de stress nutritif, impliquées par l'immersion du sédiment. Ces substances carbonées sont composées d'unités glucosyle (chaîne de β -(1,3) glucane) (Underwood & Paterson 2003, Bellinger *et al.* 2009).

III.1.2.4.3 Une distribution classique des monosaccharides ?

A cette étape, il est important de noter qu'un désoxy-sucre récurrent dans la littérature, le fucose, n'a pas été mis en évidence bien que la méthode d'analyse par CPG/SM permettait sa détection. Il est possible que cette absence de fucose soit liée aux conditions environnementales, à l'état physiologique du biofilm microphytobenthique et à la période de prélèvements (hiver). L'importance des conditions environnementales sur la dynamique de production des SPE et leurs compositions sera d'ailleurs plus longuement explicitée par la suite (III.1.2.5) grâce à une deuxième campagne de prélèvements réalisée *in situ* en juillet 2008 (été).

Par ailleurs, la présence d'inositol, usuellement détecté dans les céréales ou les fruits, est également intéressante puisqu'à l'heure actuelle, aucun auteur ne l'a mis en évidence (le *myo*-inositol étant très souvent utilisé comme étalon interne). Cette molécule est connue pour ces nombreuses fonctions : molécule de structure de nombreux messagers secondaires au sein de cellules eucaryotes, molécule du complexe de la vitamine B et surtout sa capacité à servir de facteur de croissance à de nombreuses bactéries hétérotrophes. L'inositol, probablement produit par les diatomées, pourrait donc servir de facteur symbiotique afin de promouvoir la formation des biofilms microphytobenthiques, habitats des micro-algues et des bactéries.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-7

- *cf. Hypothèses de localisation des SPE, développées en Note 1, d'après le modèle conceptuel d'Underwood & Paterson (2004).*
- *Les SPE capsulaires sont riches en sucres complexes. Elles sont pour la première fois étudiées in situ sans contamination par des polymères internes.*
- *Absence de Fucose.*
- *Détection novatrice d'inositol, facteur de croissance connu pour de nombreuses bactéries.*

III.1.2.5 Les bactéries benthiques, organismes intimement liés à la formation du biofilm benthique

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des bactéries dans les dynamiques des SPE produites sur de multiples sédiments intertidaux (Hanlon *et al.* 2006, Bellinger *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2009). Des travaux ont ainsi montré que ces micro-organismes étaient capables de produire des SPE bactériennes spécifiques mais aussi de consommer des substances polymériques présentes dans l'environnement benthique pour leur propre croissance. Dans ce sens, des auteurs ont observé une diminution des glucides colloïdaux totaux de BPM pendant l'émersion du sédiment et l'ont corrélé avec une consommation de ces substances carbonées par des bactéries hétérotrophes (Hofmann *et al.* 2009). La Figure III.1-17 présente l'évolution des densités bactériennes mesurées dans les deux premiers mm du sédiment durant les phases d'émersion.

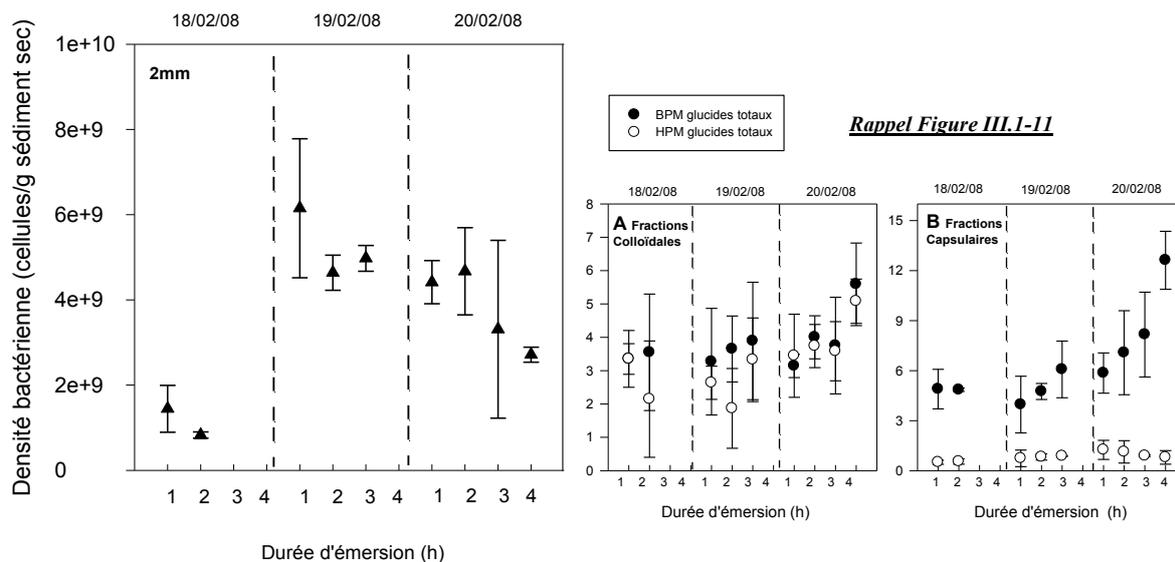


Figure III.1-17 : Evolution de la densité bactérienne mesurée au sein des deux premiers mm d'un sédiment intertidal, au cours de phases d'émersion.

Le sédiment présente des concentrations en bactéries plus importantes le 19/02/08 (5.10^9 cellules/g de sédiment sec). Les concentrations les plus faibles ont été mesurées le 18/02/08 (1.10^9 cellules/g de sédiment sec).

Cette étude n'a pas permis de mettre clairement en évidence la consommation des glucides colloïdaux de BPM par les bactéries hétérotrophes présentes, bien que la composition trouvée en monomères du contenu glucidique de ces fractions soit similaire à de nombreux études, le glucose prédominant très largement. Concernant les fractions colloïdales de HPM, la proportion du glucose au sein du contenu glucidique diminue légèrement durant toute la période d'émersion (Figure III.1-16, A) tandis que la quantité totale de glucides colloïdaux de BPM augmente légèrement. De précédentes études ont déjà montré ce phénomène qui implique une dégradation des polymères colloïdaux de HPM par des enzymes bactériennes extracellulaires, impliquant ainsi une diminution des quantités de glucides colloïdaux HPM (Hanlon *et al.* 2006, Bellinger *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2009).

D'un autre côté, l'évolution de la densité bactérienne au sein du sédiment semble être étroitement liée aux dynamiques de production des glucides capsulaires (Figure III.1-17).

Ainsi, on observe une diminution des quantités de bactéries le 20/02/08 (de 5.10^9 à $2,5.10^9$ cellules/g de sédiment sec) confirmée par les tests statistiques (différences significatives entre les points 0h, 1h et 3h, p value [5%] = 0,013). Au cours de cette même période, une forte augmentation des glucides capsulaires de BPM a été observée (Figure III.1-11, Figure III.1-17). Toutefois, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre l'évolution des densités bactériennes et les glucides capsulaires de BPM ($r = -0,21$, $R^2 = 0,044$), de HPM ($r = 0,186$, $R^2 = 0,035$) et plus généralement des glucides capsulaires ($r = -0,17$, $R^2 = 0,029$). Cette étude n'a donc pas pu significativement mettre en évidence un effet négatif potentiel des SPE capsulaires sur la division cellulaire des bactéries. On peut par ailleurs supposer que cette surabondance de BPM soit due à une sous-consommation de ces sources carbonées par les différentes populations de bactéries hétérotrophes présentes (Haynes *et al.* 2007, Hofmann *et al.* 2009, Bellinger *et al.* 2009).

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.1-8

- ***Les SPE colloïdales, de part leurs compositions, sont utilisées par les bactéries hétérotrophes du biofilm comme source carbonée.***
- ***Un effet des SPE capsulaires est supposé sur la capacité des bactéries à se diviser au sein du biofilm.***

III.1.2.6 Conclusion

Le but de ce travail était d'étudier la composition biochimique et les dynamiques de production de Substances Polymériques Extracellulaires produites au sein d'une vasière intertidale et durant le développement d'un biofilm microphytobenthique.

L'étude a mis en évidence les difficultés qu'impliquent la collecte et la séparation de différentes catégories de SPE en fonction de leurs propriétés structurales et de leur localisation dans le sédiment. Les compositions biochimiques des différentes fractions collectées sont proches de celles observées par de nombreux auteurs. Cependant, la technique d'extraction utilisée pour la première fois *in situ* a permis d'étudier plus précisément la réelle composition des fractions capsulaires.

Les SPE capsulaires, constituées à 80 % de molécules de BPM, pourraient présenter un effet négatif sur la division cellulaire des bactéries hétérotrophes au cours de l'émersion (corrélation non confirmée). Les glucides capsulaires, composés de sucres particuliers, présentent des répartitions en monomères variables à très court terme. La présence de désoxy-sucres et d'acides uroniques laissent supposer que ces fractions jouent un rôle important dans la formation et le devenir du biofilm microphytobenthique. L'absence de fucose est surprenante mais a été corrélée à l'état physiologique du biofilm et à la période de prélèvement (hiver). Par ailleurs, la découverte novatrice d'inositol au sein des fractions colloïdales notamment est intéressante puisque cette molécule pourrait être consommée, tout comme le glucose, par les nombreuses bactéries du biofilm. Enfin, cette étude ne ciblait qu'une période environnementale de l'année. Or, de nombreux travaux mettent en avant les variations importantes, en quantité et en composition, subies par les SPE au cours de changements saisonniers.

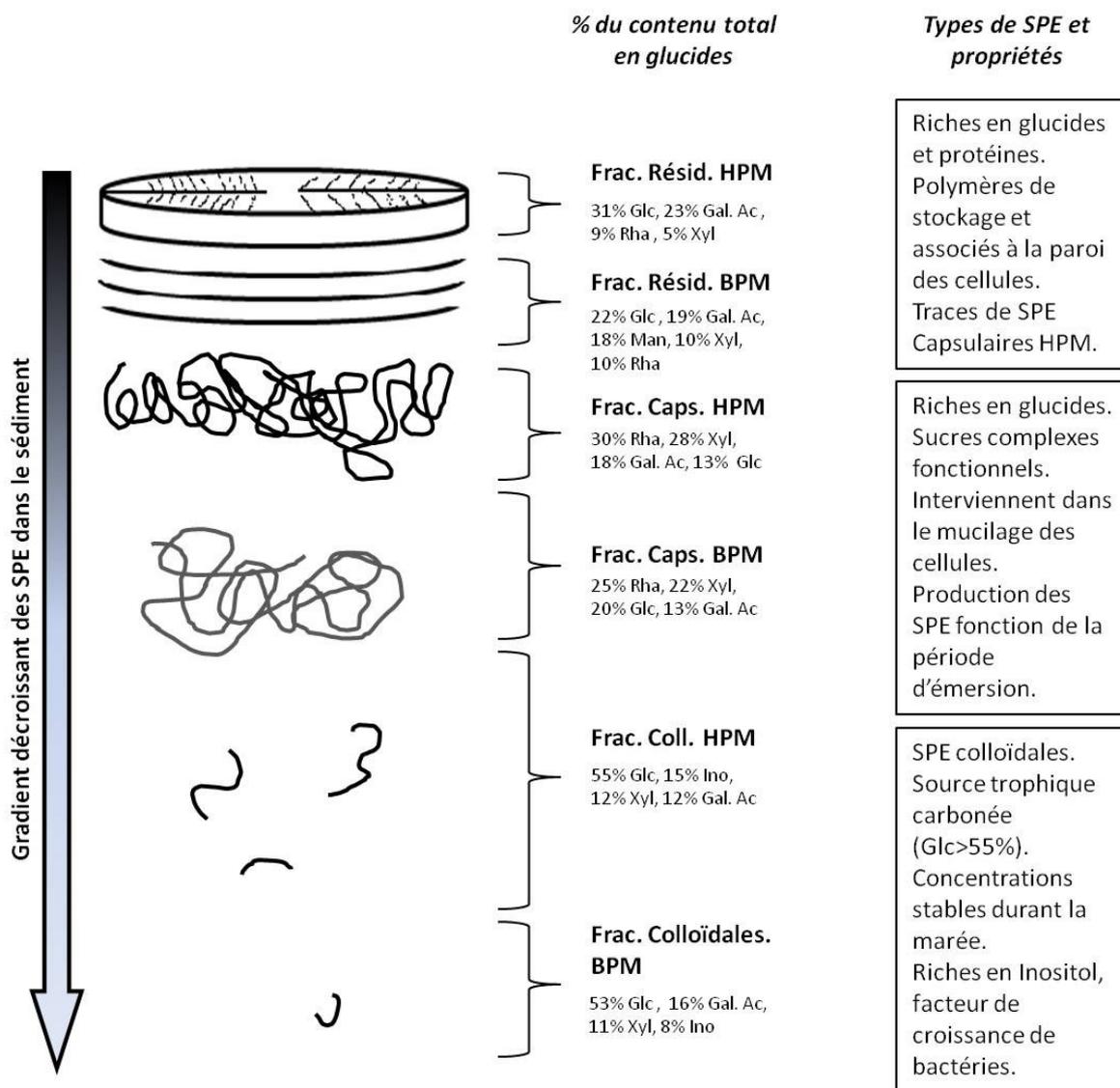


Figure III.1-18 : Hypothèses de localisation des SPE en fonction de leurs compositions et structures, basées sur le modèle conceptuel développée par Underwood & Paterson (2003) pour les exopolymères de diatomées benthiques. Les compositions en glucides (%) sont moyennées sur toute la durée de l'émerison.

III.2 ETUDE DES PROPRIETES DE SURFACE DE MICRO-ORGANISMES DANS L'ELABORATION DE BIOFILMS

Un biofilm se définit comme un agglomérat sur une surface donnée de micro-organismes, étroitement liés à des gangues d'exopolymères jouant le rôle de matrice adhésive. Ce deuxième mode de vie dit « statique » ou sessile, inversement à la flottaison libre planctonique en milieu liquide, est fréquemment rencontré dans divers environnements (sols, métaux, eaux stagnantes) et permet d'apporter une organisation complexe aux organismes unicellulaires, organisation parfois indispensable à leur survie, notamment en milieu hostile. Ce type de micro-consortium s'organise au sein de matrices complexes et variées qui permettent, de par leurs compositions, de générer des voies de circulation métabolique afin d'assurer la résistance de cette entité physiologique face aux stress environnementaux (Tolker-Nielsen & Moblin 2000). Le développement d'une communauté de micro-organismes sous la forme d'un biofilm passe par un certain nombre de phases majeures, dépendantes de processus chimiques et biologiques spécifiques, parfois mal connus : l'adhésion, la consolidation et la colonisation. Agir sur les phases précoces de la formation d'un biofilm apparaît comme une stratégie idéale, notamment pour lutter contre la contamination de matériel médical ou alimentaire. En effet, la formation d'un biofilm est conditionnée par la capacité des micro-organismes à interagir avec un matériau donné dans des conditions environnementales précises. Les propriétés physico-chimiques de surface de ces trois acteurs sont ainsi étroitement interdépendantes et vont conditionner la formation du biofilm. Elles incluent différentes composantes : propriétés de Lifshitz-van der Waals, de nature hydrophobe, acide/base de Lewis, électrostatique et brownienne¹. Cette étude avait pour objectif de développer une nouvelle méthode, la Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI), afin d'étudier et caractériser les propriétés de surface de micro-organismes et de mieux appréhender et comprendre l'adhésion primaire, étape-clé de la formation d'un biofilm. Les résultats obtenus par CGI ont été comparés à ceux fournis par des méthodes classiques d'analyse de propriétés de surface utilisées depuis plusieurs décennies, afin d'évaluer l'efficacité et le bien fondé de cette méthode chromatographique dans la caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes.

¹ Les interactions électrostatique et brownienne sont habituellement négligées pour des particules de la taille de bactéries (Boutaleb 2007).

III.2.1 Préparation des cellules microbiennes

III.2.1.1 Culture de routine et standardisation

Afin de déterminer les conditions de culture et de conservation les mieux adaptées aux problèmes posés, à savoir déterminer les propriétés de surface des micro-organismes testés, les cultures de routine ont été standardisées à partir des travaux de Bellon-Fontaine *et al.* (1996), afin d'obtenir de manière fiable une répétabilité maximale de l'état physiologique des cellules microbiennes. En effet, certaines études ont mis en évidence que des modifications de l'état physiologique des cellules microbiennes pouvaient s'accompagner de changements phénotypiques (Luppens *et al.* 2002) et génotypiques majeurs (Stanley *et al.* 2003), entraînant des variations dans la synthèse de nombreux constituants cellulaires et influant ainsi directement sur les propriétés de surface des cellules.

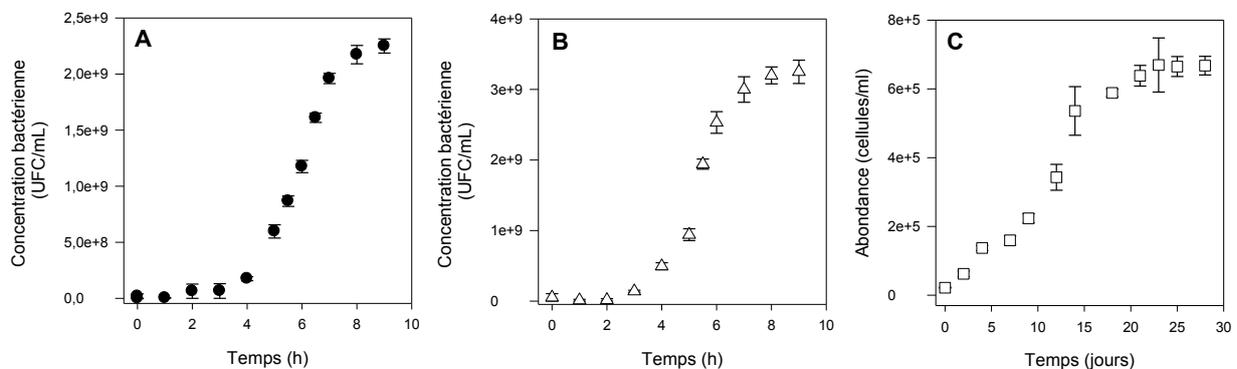


Figure III.2-1 : Evolution des croissances de *Lactococcus lactis* (A), *Hafnia alvei* (B) et *Navicula jeffreyi* (C) dans leurs milieux de croissance respectifs. Les croissances des deux bactéries modèles ont été suivies après le troisième repiquage (R3). La croissance de la micro-algue a été suivie quant à elle en continu (aucune phase de repiquage).

La figure III.2-1 présente les résultats de suivi de croissance obtenus par dénombrement sur gélose PCA (*cf.* II.2.1.5.1, p. 146) à partir de cultures fraîches de *Lactococcus lactis* (R3) et *Hafnia alvei* (R3).

Des dénombrements par numération¹ ont permis de suivre la croissance de *Navicula jeffreyi*. Ces représentations permettent de déterminer la biomasse de chaque micro-organisme disponible avant l'étape de lyophilisation et après l'étape de lyophilisation (Tableau III.2-1) afin d'évaluer notamment la viabilité des cellules bactériennes après lyophilisation.

Tableau III.2-1 : Détermination des concentrations massiques des lyophilisats microbiens.

Micro-organismes	<i>Lactococcus lactis</i> ^a	<i>Hafnia alvei</i> ^a	<i>Navicula jeffreyi</i> ^b
Concentration en fin de croissance (UFC/mL)^a ou (cellules/mL)^b	2,25E+09	3,25E+09	6,68E+05
Biomasse à lyophiliser (cellules/10mL)	2,25E+10	3,25E+10	6,68E+06
Masse récupérée après lyophilisation (mg)	105	130	145
Concentration massique du lyophilisat microbien (cellules/mg)	2,14E+08	2,50E+08	4,60E+04

L'optimisation des protocoles de culture et de suivi de croissance a permis de définir des biomasses et des concentrations standards, (corrélées à des observations microscopiques) garantant d'une répétabilité optimale des conditions physiologiques des micro-organismes étudiés et donc de leurs propriétés de surface.

III.2.1.2 Effets de la lyophilisation sur la surface des micro-organismes

Certaines études ont mis en évidence le caractère partiellement destructeur de la lyophilisation sur des cellules bactériennes ou micro-algales (Wigglesworth-Cooksey *et al.* 2001). La standardisation des protocoles de culture et de lyophilisation doit permettre de s'assurer de la répétabilité des échantillonnages sur l'état physiologique des cellules microbiennes. L'intégrité cellulaire de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* après lyophilisation a donc été vérifiée.

¹ Des dénombrements par numération sur cellule de Malassez ont été réalisés. Cette méthode a également été appliquée pour suivre les croissances de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvia*. Les résultats ne sont pas présentés, étant redondants avec la Figure III.2-1 A, B.

Dans un premier temps, des tests de viabilité ont été réalisés sur chaque lyophilisat bactérien¹ par la méthode de référence de dénombrement de micro-organismes aérobies revivifiables sur PCA.

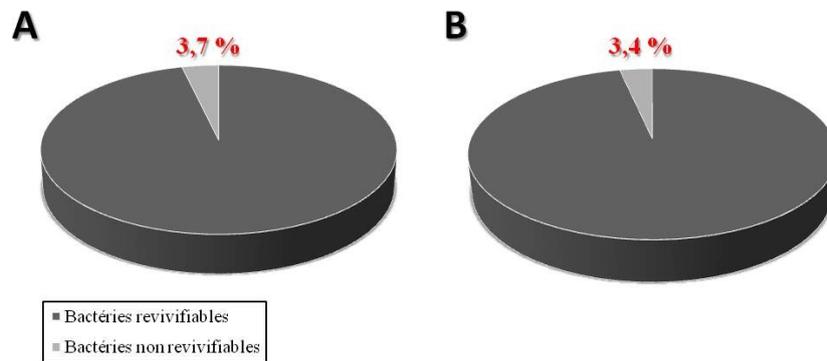


Figure III.2-2 : Proportion de bactéries non revivifiables après lyophilisation des échantillons de *Lactococcus lactis* (A) et *Hafnia alvei* (B).

On constate ainsi que plus de 96 % des populations bactériennes sont revivifiables après lyophilisation. La méthode de dénombrement a permis de dénombrer des colonies d'aspects similaires, semblables aux colonies observées avant lyophilisation et ce pour les deux bactéries. La lyophilisation ne semble ni affecter significativement l'intégrité des cellules bactériennes (indice de viabilité cellulaire supérieur à 96 %) ni être à l'origine de mutations majeures (observables par leur morphologie). Des analyses par MEB ont été menées sur chacun des lyophilisats microbiens afin de conforter ces résultats (Figure III.2-3). Les structures microbiennes (A, B, C) observées correspondent à leur description morphologique (cf. II.2.1.1, p. 142). Les tapis bactériens formés lors de la lyophilisation sont relativement cohésifs et sont constitués de cellules ordonnées intactes. Peu de débris cellulaires sont observés au sein des échantillons.

¹ La méthode n'est pas applicable aux diatomées.

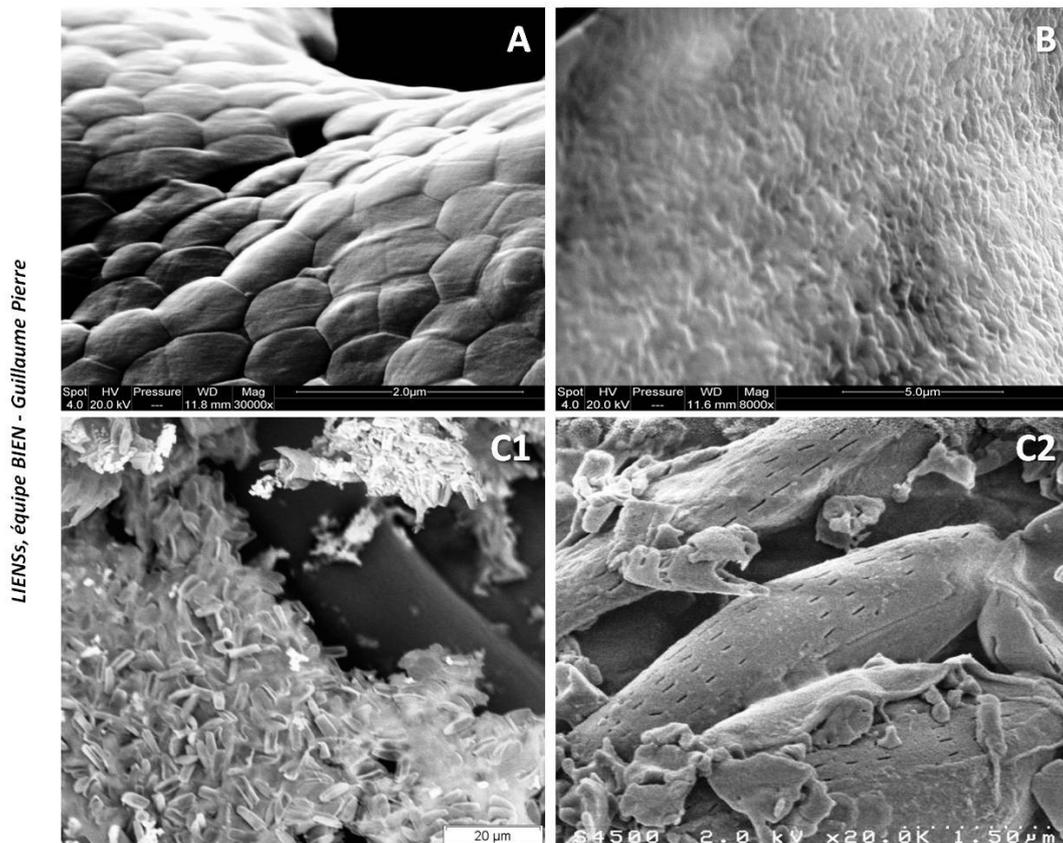


Figure III.2-3 : Surfaces bactériennes après lyophilisation de *Lactococcus lactis* (A), *Hafnia alvei* (B) et *Navicula jeffreyi* (C1, C2) observées par MEB.

L'échantillon de *Navicula jeffreyi* présente des structures supplémentaires (C1, C2) qui pourraient s'apparenter à des substances polymériques produites par les diatomées (Costerton *et al.* 1981). Les observations par MEB confirment finalement les résultats obtenus par numération : l'étape de lyophilisation n'endommage pas la paroi des cellules étudiées.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-1

- ***Méthodologie standardisée.***
- ***Echantillons reproductibles.***
- ***Permet l'analyse correcte et reproductible des propriétés de surface de micro-organismes.***

III.2.2 Comparaison des différentes méthodes classiques d'analyse des propriétés globales de surface des micro-organismes modèles

Les techniques utilisées dans cette étude (*cf. Note 2, p. 223*) sont des méthodes classiques d'analyse pour la caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface de cellules bactériennes. Incontournables, elles permettent d'accéder à des informations primordiales à la compréhension des phénomènes intervenant dans l'adhésion microbienne, notamment l'étape primaire de l'adhésion.

III.2.2.1 Charge globale de surface des cellules bactériennes

Les propriétés électriques de surface des micro-organismes ont été évaluées par des mesures de mobilité électrophorétique. Les résultats obtenus pour chacune des souches bactériennes sont présentés en Figure III.2-4. Les deux souches bactériennes présentent une importante électronégativité de surface sur la gamme étudiée de pH, notamment à un pH proche de la neutralité (Pelletier *et al.* 1997). Selon certains auteurs, les groupements carboxylate et phosphate joueraient un rôle prédominant dans la détermination de la charge négative de surface cellulaire microbienne (Latrache *et al.* 1994 ; Pelletier *et al.* 1997 ; Hamadi *et al.* 2005).

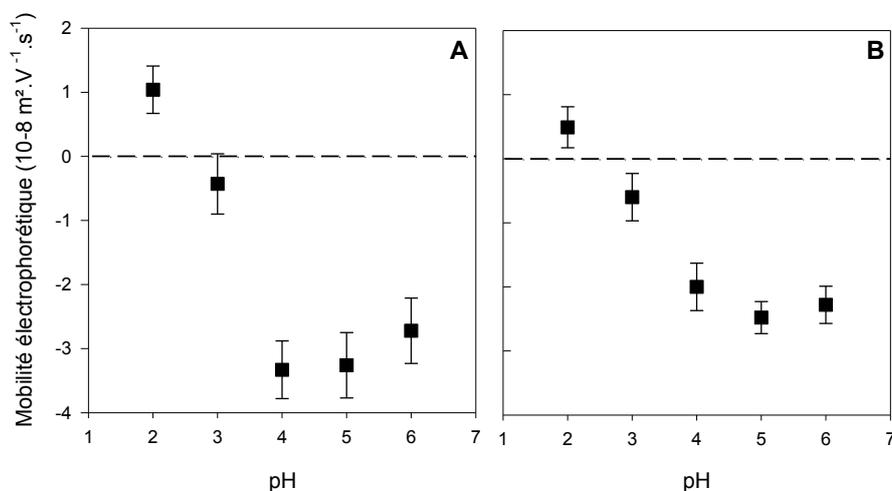
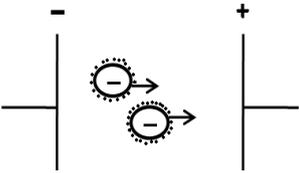
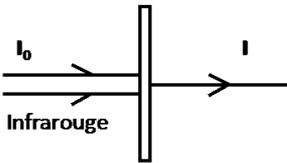
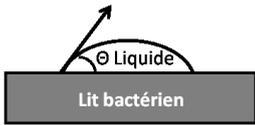
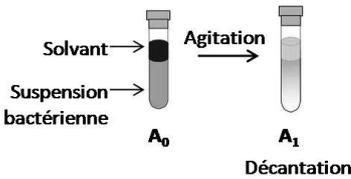


Figure III.2-4 : Mobilité électrophorétique des souches de *Lactococcus lactis* (A) et *Hafnia alvei* (B) sur une gamme de pH allant de 2 à 6, à température ambiante.

Tableau III.2-2 : Récapitulatif des techniques classiques employées dans la caractérisation des propriétés physico-chimiques de surface de cellules bactériennes au cours de cette étude, adaptée de van der Mei et al. (1991).

Méthode	Principe	Paramètres physico-chimiques obtenus	Précision de l'information
Micro-électrophorèse	 <p style="text-align: center;">Suspension bactérienne</p>	Potentiel Zêta Charge globale de surface	Surface cellulaire (minimum 1 nm) ^a
Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	 <p style="text-align: center;">Bactéries lyophilisées</p>	Composition globale de surface	de l'ordre du micron
Mesure d'angles de contact		Energies libres de surface	< 0,5 nm
Microbial Adhesion to Solvents (MATS)		Caractère acide/base de Lewis Hydrophobicité	Surface cellulaire (minimum 1 nm) ^b

^a La distance entre la surface bactérienne et le plan de cisaillement est au minimum de 1 nm mais peut augmenter en présence d'appendices cellulaires de surface.

^b Bien que la Spectroscopie Infrarouge soit considérée comme une technique grossière, de nombreux travaux ont montré que des différences significatives étaient observables entre la composition moléculaire de surface de différents micro-organismes.

Les valeurs maximales atteintes sont cohérentes avec d'autres travaux réalisés sur des micro-organismes différents (Allion 2003). On observe qu'à des pH acides, les valeurs de mobilités électrophorétiques diminuent jusqu'à devenir nulles (Point de Charge Nulle, PCN) à pH 2,6 pour *Lactococcus lactis* et 2,2 pour *Hafnia alvei*. On suppose que cette évolution différente des charges de surface est attribuable à la présence de groupements carboxyle/phosphate constitutifs des polysaccharides présents au sein de la paroi bactérienne de *Lactococcus lactis* (bactérie à coloration de Gram positif) (Rijnaarts *et al.* 1995).

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-2

- *Lactococcus lactis* présente la plus forte électronégativité de surface.
- Selon Jana *et al.* (2000), des interactions électrostatiques élevées sont à l'origine d'une diminution du phénomène d'adhésion.
- *Lactococcus lactis* présente une capacité d'adhésion plus faible qu'*Hafnia alvei*.

III.2.2.2 Composition moléculaire de surface des micro-organismes

Dans un premier temps, les compositions moléculaires de surface de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei* ont été analysées par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (Figure III.2-5). Si l'on considère la complexité des surfaces bactériennes, les spectres infrarouges obtenus sont relativement simples à interpréter et sont cohérents avec d'autres résultats décrits dans la littérature (van der Mei *et al.* 1991). Les mêmes bandes majoritaires d'absorption sont visibles pour chaque bactérie, avec des variations d'intensité : autour de 3300 cm^{-1} (combinaison des bandes OH et NH), 2930 cm^{-1} (élongation CH), 1637 cm^{-1} (C=O, élongation des protéines, connues comme amide I : AmI), 1540 cm^{-1} (liaison N-H des protéines, connues comme amide II : AmII), 1452 cm^{-1} (groupement CH_2), 1400 cm^{-1} (groupement CH_3), 1234 cm^{-1} (PI : élongation asymétrique des groupements phosphate d'acide téichoïque de surface membranaire) et 1078 cm^{-1} (PII : modes de vibration complexe des polysaccharides).

Les absorbances des bandes AmI, AmII, PI et PII ont été normalisées en respectant l'élongation CH à 2950 cm^{-1} . On constate une intensité plus forte des bandes d'absorption PI et PII (polysaccharides) chez *Lactococcus lactis*. Cette différence entre les deux bactéries correspond probablement à la constitution particulière de la paroi de cette bactérie à coloration de Gram Positif, plus riche en peptidoglycane que la paroi des bactéries à coloration de Gram négatif (*Hafnia alvei*).

Sur l'ensemble des manipulations, réalisées en triplicatas sur trois cultures séparées de chaque bactérie, moins de 2 % de différence ont été observées pour chaque analyse. Ce premier constat montre très clairement que la méthode de préparation des bactéries est répétable (culture, lavage, lyophilisation, stockage) et ne modifie pas la composition moléculaire de surface de ces dernières conformément aux précédentes conclusions (cf. III.2.1, p. 218-219). Par ailleurs, la méthodologie utilisée notamment pour les mesures par CGI implique le stockage des échantillons lyophilisés à 4°C et leur analyse à 40°C . On pourrait alors craindre que la température puisse avoir une influence non négligeable sur les propriétés de surface des bactéries étudiées.

Le Tableau III.2-3 présente les variations d'intensités des bandes majoritaires d'absorption observées pour chacune des bactéries à 4 et 40°C . On constate qu'aucune différence significative n'a été observée entre les spectres infrarouges obtenus à 4 et 40°C pour les deux bactéries. L'élévation de la température d'étude ne modifie donc pas la composition moléculaire de surface des bactéries. Le passage d'un stockage à 4°C à une analyse par CGI à 40°C n'est donc pas problématique, si on se base sur la sensibilité de la Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier.

Tableau III.2-3 : Evolution de l'intensité des bandes majoritaires d'absorption par spectrométrie infrarouge de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei* suite à l'élévation de la température d'étude (4°C à 40°C). Toutes les bandes d'absorptions ont été normalisées en respectant l'élongation CH autour de 2930 cm^{-1} .

Souches	Δ AmI/CH	Δ AmII/CH	Δ CH ₂ /CH	Δ CH ₃ /CH	Δ PI/CH	Δ PII/CH
<i>Lactococcus lactis</i> 40°C	+ 0,13	+ 0,18	+ 0,85	+ 0,96	+ 0,92	+ 0,24
<i>Hafnia alvei</i> 40°C	+ 0,0033	0	0	0	+ 0,059	+ 0,0057

CH: bandes d'absorption CH₂-CH₃ aux alentours de 2930 cm^{-1}
 AmI, AmII: bandes d'absorption Amide I et II à 1637 cm^{-1} et autour de 1540 cm^{-1} respectivement
 PI, PII: bandes d'absorption Phosphate/Sucre à 1234 cm^{-1} et autour de 1078 cm^{-1} respectivement

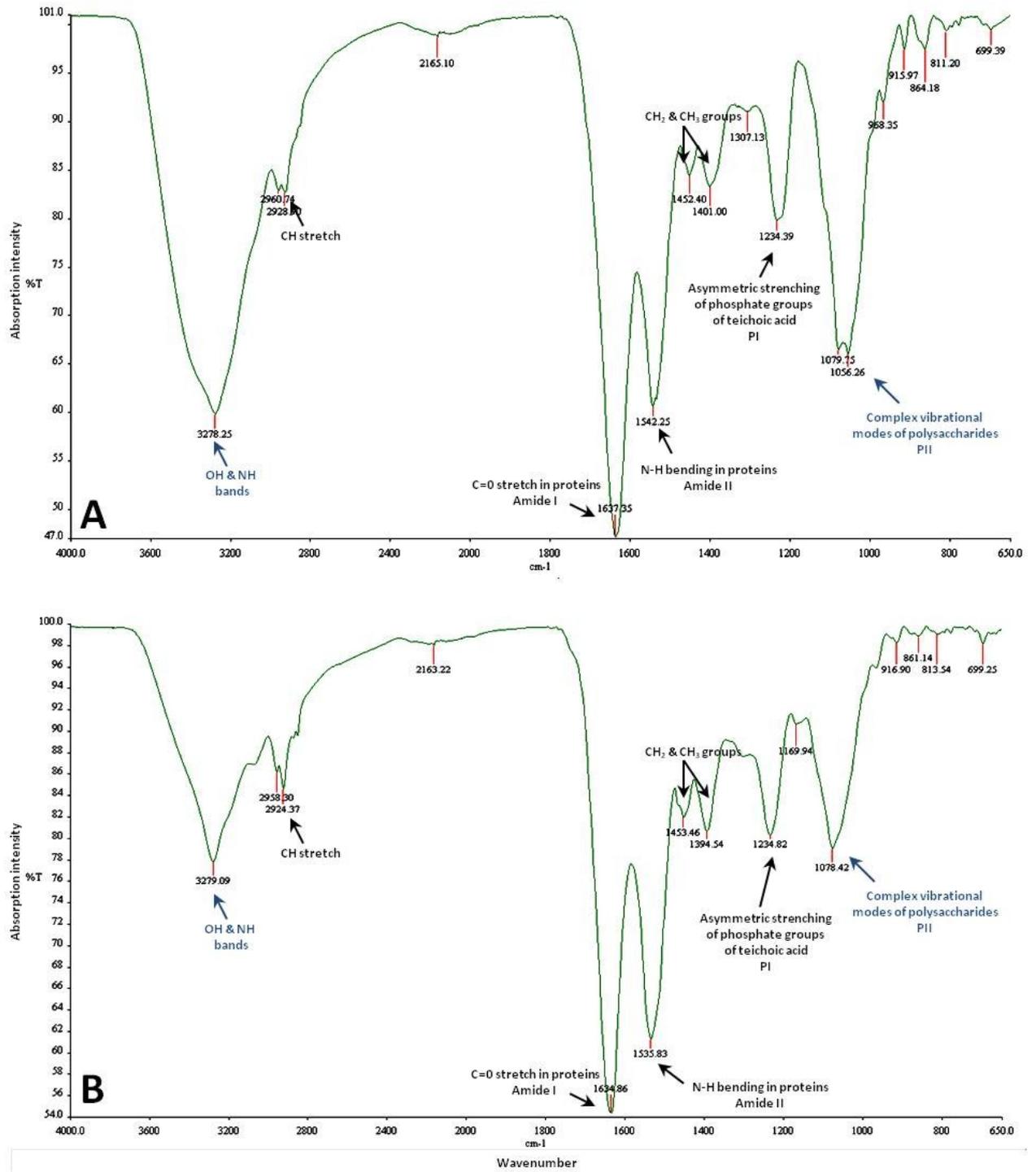


Figure III.2-5 : Compositions moléculaires de surface de *Lactococcus lactis* (A) et *Hafnia alvei* (B) obtenues par Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier à température ambiante.

La Figure III.2-6 présente la composition moléculaire de surface de la micro-algue *Navicula jeffreyi*. Le profil infrarouge est similaire aux spectres observés pour les deux bactéries modèles.

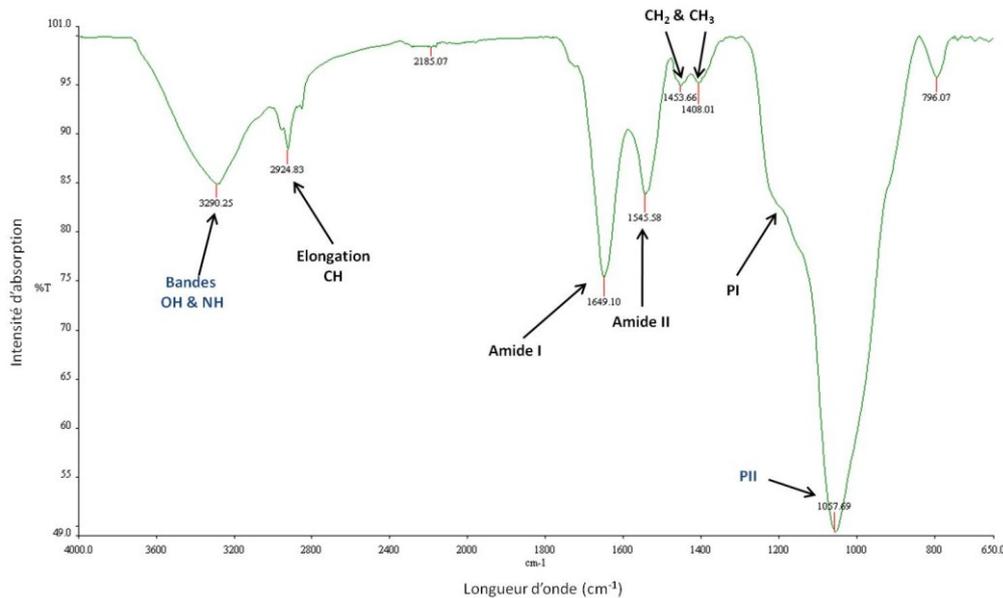


Figure III.2-6 : Composition moléculaire de surface de *Navicula jeffreyi* obtenue par Spectrométrie Infrarouge à Transformée de Fourier à température ambiante.

On constate cependant que les intensités des bandes majoritaires sont différentes, traduisant une composition moléculaire de surface unique. Les rapports des bandes d'absorption AmI/CH et AmII/CH indiquent que la surface de *Navicula jeffreyi* est moins riche en protéines que les surfaces de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*. A l'inverse, les rapports PI/CH et PII/CH mettent en évidence l'abondance de polysaccharides à la surface de la micro-algue. Ce résultat confirme d'ailleurs l'ensemble des observations microscopiques et conclusions citées précédemment (cf. III.2.1.2, p. 219) concernant la présence de substances polymériques (exopolysaccharides), abondantes à proximité des cellules de diatomées (Figure III.2-3, C2).

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-3

- **Aucun effet de la température sur la composition globale de surface.**
- **Bandes d'absorption PI et PII plus élevées pour *Lactococcus lactis*.**
- **Composition globale de surface de *Navicula jeffreyi* très riche en polysaccharides.**

III.2.2.3 Mesure des angles de contact de tapis bactériens

La méthode pour mesurer les angles de contact de tapis bactériens, préalablement déposés sur des membranes filtrantes, est très largement décrite dans la littérature (van der Mei 1989) et permet notamment de caractériser l'hydrophobicité du tapis solide étudié. L'obtention de résultats répétables et interprétables nécessite de travailler sur un tapis bactérien homogène et lisse afin d'éviter tout artefact lié à l'état structurel et la topographie du tapis (van der Mei *et al.* 1991). L'élaboration d'un tapis bactérien de qualité nécessite donc une attention particulière. De nombreux travaux ont mis en évidence certaines conditions majeures indispensables¹ à l'obtention d'un tapis bactérien homogène (van der Mei *et al.* 1991). La technique des membranes de filtration a été préférée aux autres méthodes au cours de cette étude, ces dernières présentant moins d'interactions intrinsèques durant les mesures d'angles de contact, à l'inverse des gels d'agar par exemple (van der Mei *et al.* 1991).

L'élaboration d'un tapis bactérien homogène a donc nécessité la mise en place d'un protocole particulier. Différents paramètres ont été testés afin d'en optimiser l'élaboration (Tableau III.2-4). Les différents tests ont été menés sur les souches bactériennes de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*.

Tableau III.2-4 : Détermination des paramètres optimaux nécessaires à l'obtention d'un tapis bactérien homogène par la technique des membranes de filtration.

	Etat bactérien	Concentration de la suspension bactérienne (cellules/mL) ²	Volume de suspension à filtrer (mL)	Filtration sous vide léger	Temps de séchage des filtres (min)
Paramètres modifiés indépendamment	- culture fraîche	4.10 ⁸	5		30
	- rincée (R3)	2.10 ⁹	10	- oui	45
	- lyophilisat	2.10 ¹⁰	40	- non	60
			80		

¹ Conditions majeures : tapis bactérien homogène et uniforme, dépôt successif de 50 lits bactériens sur des membranes de filtration ou des gels d'agar, utilisation d'une légère pression sous vide, eau comme liquide de suspension.

² Calculées (cf. III.2.1.1, p. 218).

Pour *Lactococcus lactis* : [lyophilisat] = 2,14.10⁸ cellules/mg ; [culture fraîche R3] = 2,25.10⁹ cellules/mL.

Pour *Hafnia alvei* : [lyophilisat] = 2,50.10⁸ cellules/mg ; [culture fraîche R3] = 3,25.10⁹ cellules/mL.

La détermination des paramètres optimaux pour l'élaboration d'un tapis bactérien homogène et cohésif a été réalisée par l'intermédiaire d'observations microscopiques (MEB notamment) ainsi que par la mesure d'angles de contact.

III.2.2.3.1 Etat physiologique des bactéries et filtration sous vide

L'état physiologique des bactéries (culture fraîche ou lyophilisat) ainsi que l'intérêt d'utiliser un vide léger pendant la filtration ont été analysés. La Figure III.2-7 présente les photographies MEB des tapis bactériens réalisés avec ou sans filtration sous vide de la bactérie *Lactococcus lactis*, obtenue à partir de cultures fraîches ou de lyophilisats.

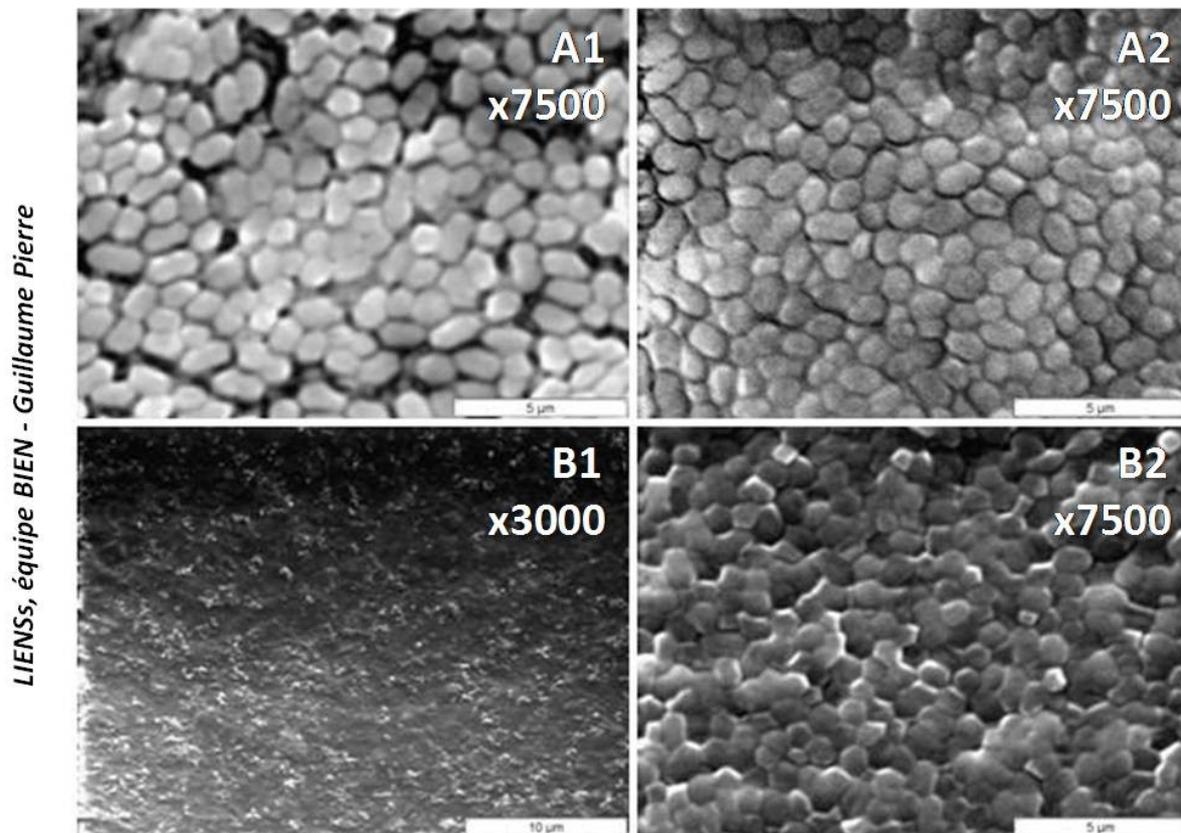


Figure III.2-7 : Tapis bactériens obtenus à partir d'un lyophilisat de *Lactococcus lactis* (A) et d'une culture fraîche de *Lactococcus lactis* (B), avec (2) ou sans (1) filtration sous vide léger des bactéries (paramètres fixés : concentration de la suspension bactérienne de 2.10^9 cellules/mL, volume filtré de 40mL et temps de séchage de 60min).

Dans un premier temps, on constate que le fait de lyophiliser ou non les cellules bactériennes n'empêche pas l'élaboration d'un tapis bactérien. Dans chacun des cas (A ou B), un tapis similaire et relativement homogène est obtenu.

L'utilisation ou non du vide semble quant à elle plus importante. En effet, on constate que l'utilisation d'un vide léger permet l'obtention d'un tapis plus plat, sans disparité (comparaison entre A1 et A2). En outre, l'absence d'une filtration sous vide semble avoir tendance à former des surcouches de bactéries, à l'origine d'amoncellements bactériens, structures non souhaitées pour l'analyse par goniométrie. Cet entassement des bactéries est en partie visible par MEB puisqu'il est à l'origine d'une perte de résolution importante à plus fort grossissement, qui se traduit par l'impossibilité de voir les cellules et la présence de zone facilement brûlable par le faisceau d'électrons. La Figure III.2-7 présente un tapis bactérien de *Lactococcus lactis*, reconstitué de manière factice sur lame de Polysine¹, afin d'illustrer ce phénomène d'amoncellements bactériens. Les zones les plus foncées correspondent à des surcouches importantes de bactéries, ces dernières adhérant plus facilement sur une surface déjà partiellement colonisée. Dans ce cas, les mesures d'angles de contact ne pourront pas être homogènes, l'échantillon présentant différents plans bactériens selon la localisation sur le tapis.

LIENSs, équipe BIEN - Guillaume Pierre
INRA-UBHM, Jean-Marie Herry

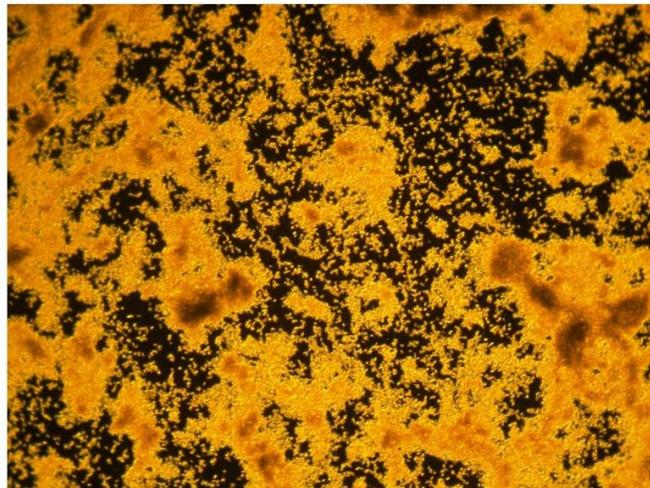
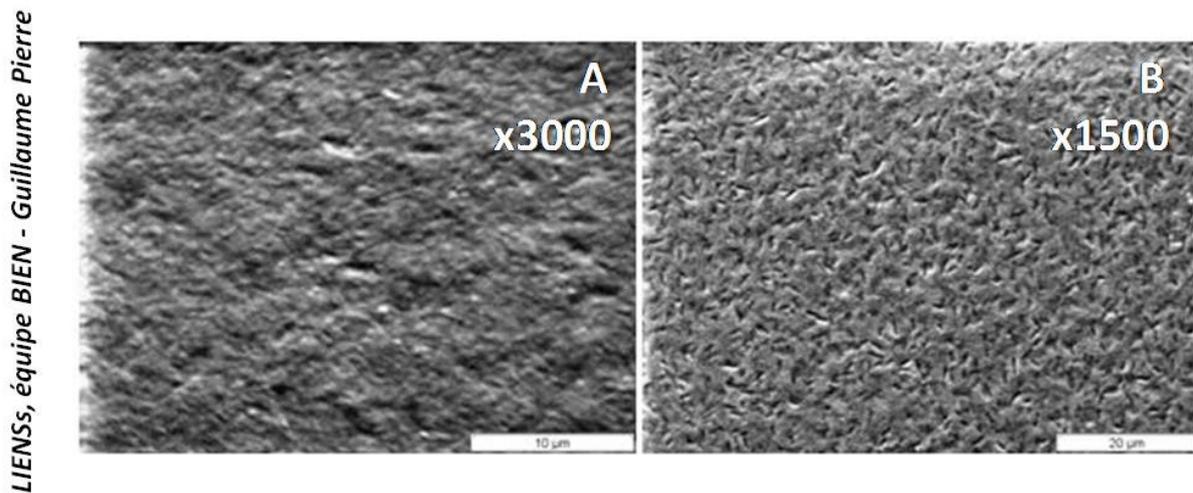


Figure III.2-8 : Tapis bactérien de *Lactococcus lactis* déposé sur une lame de Polysine, observé par microscopie optique (Imagerie LEICA DMLB, fond noir, grossissement x10).

¹ Le comportement des bactéries sur une lame de Polysine ou une membrane de triacétate de cellulose n'est pas exactement le même, les surfaces étant chargées différemment. Le tapis présenté en Figure III.2-8 ne sert qu'à illustrer l'hypothèse d'amoncellements bactériens.

De manière générale, on peut conclure que l'utilisation de bactéries lyophilisées n'est pas problématique pour l'élaboration d'un tapis bactérien stable et relativement uniforme.

L'utilisation d'un vide maîtrisé permet d'améliorer son homogénéité, conformément à certains travaux décrits dans la littérature (van der Mei *et al.* 1991). Les mêmes conclusions ont été émises pour la souche d'*Hafnia alvei* (Figure III.2-9).



*Figure III.2-9 : Tapis bactériens obtenus à partir d'un lyophilisat d'*Hafnia alvei* avec (B) ou sans (A) filtration sous vide léger (paramètres fixés : état lyophilisé, concentration de la suspension bactérienne de 2.10^9 cellules/mL, volume filtré de 40 mL et temps de séchage de 60min).*

III.2.2.3.2 Concentration et volume de suspension bactérienne à filtrer

Concernant la concentration et le volume de suspension bactérienne à filtrer, l'analyse par MEB a montré une topographie plus marquée des différents tapis bactériens lors de l'utilisation de suspensions de concentrations et de volumes plus élevés (Figure III.2-10).

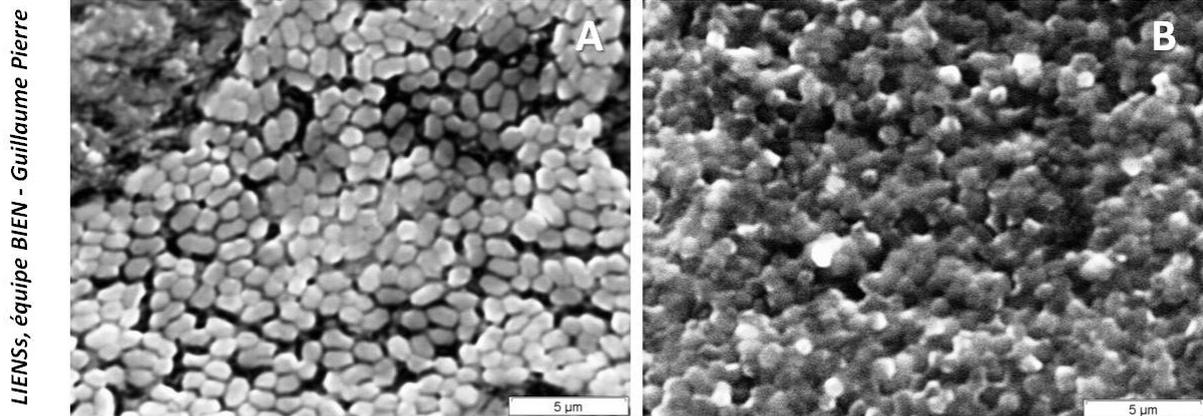


Figure III.2-10 : Tapis bactérien de *Lactococcus lactis*. Conditions fixes : état lyophilisé, temps de séchage de 60 min. Conditions variables : (A) concentration de la suspension bactérienne de 2.10^9 cellules/mL et volume filtré de 80 mL ; (B) concentration de la suspension bactérienne de 2.10^{10} cellules/mL et volume filtré de 40mL.

La surface semble moins plane et lisse pour un volume de filtration de 80mL (Figure III.2-10, A) que pour un volume de filtration de 40mL (Figure III.2-7, A2). Cette topographie marquée a été constatée lors des mesures d'angles de contact via l'observation de phénomènes d'hystérésis lors du dépôt des gouttes (van der Mei *et al.* 1991). L'utilisation de suspensions bactériennes plus concentrées a permis d'obtenir des tapis relativement homogènes (Figure III.2-10, B). Toutefois, la mesure des angles de contact sur ces tapis a mis en évidence des problèmes de cohésion bactérienne. En effet, la partie supérieure des tapis avait tendance à se détacher et s'éparpiller sur la goutte de solvant (Figure III.2-11, B1), voire se resuspendre dans cette même goutte (Figure III.2-11, B2).

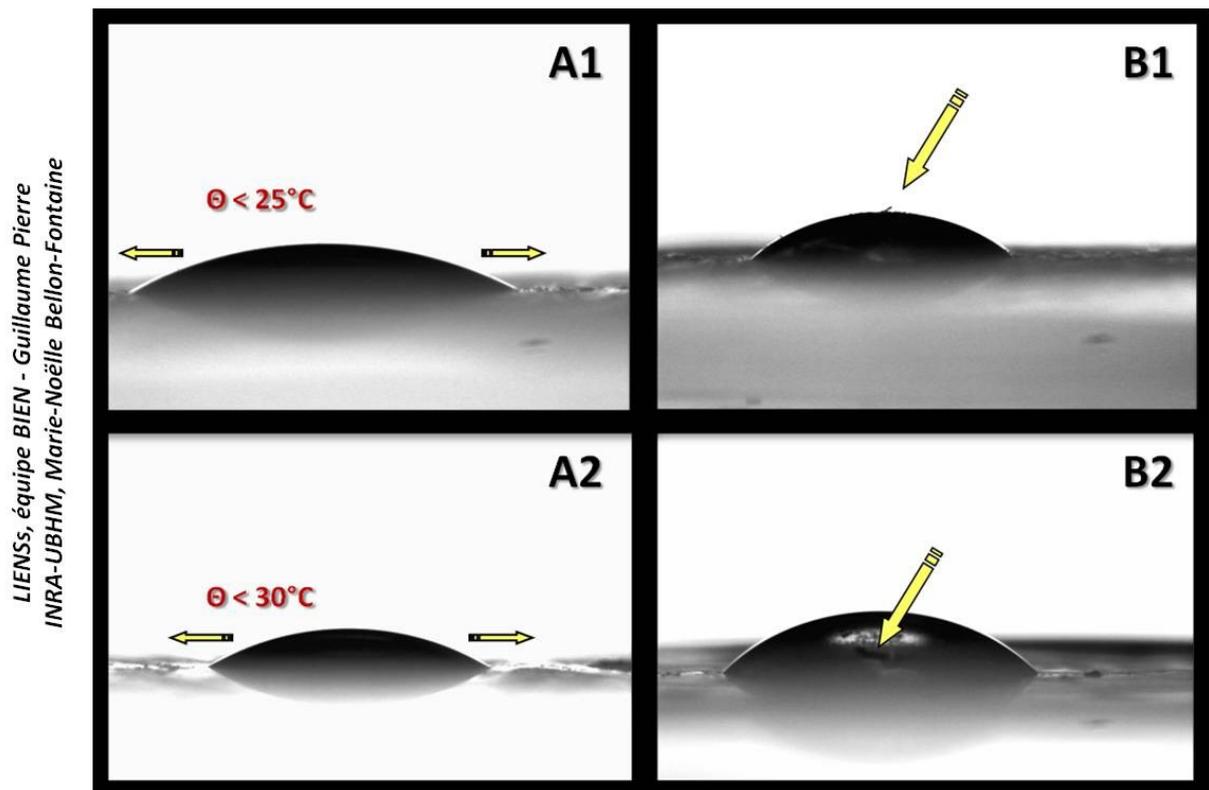


Figure III.2-11 : Exemples de problèmes rencontrés lors de la mesure des angles de contact formés entre l'eau et différents tapis bactériens de *Lactococcus lactis*. Les tapis bactériens A1 et A2, élaborés avec de faibles concentrations (4.10^8 cellules/mL) et volumes bactériens (5 mL), mettent en évidence des problèmes cohésifs (absorption) dès le dépôt de la goutte d'eau. Les tapis bactériens B1 et B2, préparés à partir de concentrations (2.10^{10} cellules/mL) et volumes bactériens (80 mL) élevés, montrent des perturbations cohésives dès le dépôt de la goutte d'eau par détachement et resuspension du lit. Paramètres fixés : état lyophilisé, temps de séchage de 60 min.

A des concentrations de suspension bactérienne ou des volumes de filtration plus faibles, les mesures d'angles de contact n'étaient quant à elles pas significatives. En effet, la mauvaise cohésion du tapis était à l'origine d'une pénétration immédiate (absorption) de chaque solvant (Figure III.2-11, A1, A2). Par ailleurs, de nombreuses mesures d'angles de contact ont donné des résultats similaires à ceux obtenues pour une membrane de filtration seule (témoin), laissant supposer que des zones de la membrane devaient être inoccupées par les bactéries.

III.2.2.3.3 Durée de séchage des tapis bactériens

Concernant le temps de séchage, 30 min au moins sont nécessaires pour obtenir un tapis bactérien cohésif et homogène. Les analyses par goniométrie ont montré qu'il était indispensable de travailler sur une membrane de filtration encore légèrement humide pour éviter des problèmes d'absorption des solvants. 30 min de séchage sont nécessaires mais des temps de séchage supérieurs peuvent être utiles en fonction des bactéries utilisées (van der Mei *et al.* 1991). L'état d'humidité du tapis bactérien est à l'appréciation de l'expérimentateur malheureusement.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-4

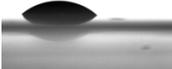
- ***Elaboration d'un tapis bactérien homogène et cohésif dans les conditions suivantes.***
- ***Etat physiologique des micro-organismes non déterminant.***
- ***Utilisation d'un vide léger pendant la filtration.***
- ***40 mL d'une suspension bactérienne à 2.10^{10} cellules/mL.***
- ***30 min au moins de séchage.***

III.2.2.3.4 Mesure des angles de contact de tapis microbiens cohésifs et homogènes

Les conditions optimales de préparation d'un tapis homogène et cohésif ont été usitées, à savoir l'utilisation de micro-organismes lyophilisés, d'une concentration de la suspension de 2.10^{10} cellules/mL, d'un volume de suspension de 40 mL, d'un vide léger pendant la filtration et d'un temps de séchage d'au moins 30 min de la membrane de filtration. Les manipulations ont été réalisées sur des tapis de *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi*. Les résultats sont présentés dans le Tableau III.2-5.

Tableau III.2-5 : Energies de surface des micro-organismes *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi*, déterminées par mesures des angles de contact de tapis bactériens homogènes et cohésifs. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicatas.

<i>Souches modèles</i>	Différentes composante de l'énergie de surface				
	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^t (mJ/m ²)
<i>Lactococcus lactis</i>	34,5 ± 0,4	57,7 ± 5,4	0,80 ± 0,3	12,8 ± 4,3	47,8 ± 4,3
<i>Hafnia alvei</i>	32,8 ± 1,5	38,2 ± 5,6	0,60 ± 0,3	11,8 ± 4,3	44,6 ± 4,5
<i>Navicula jeffreyi</i>	31,8 ± 1,2	16,2 ± 4,9	0,35 ± 0,4	4,9 ± 3,4	36,7 ± 3,7
<i>Membrane seule</i>	37,6 ± 0,4	28,3 ± 1,3	0,10 ± 0,1	3,5 ± 1,6	41,1 ± 1,1

<i>Souches modèles</i>	Angles de contact (°)							
	Diiodométhane		Ethylène glycol		Formamide		Eau	
<i>Lactococcus lactis</i>	46,6 ± 0,8		36 ± 3,9		36,3 ± 4,2		21,4 ± 4	
<i>Hafnia alvei</i>	52,6 ± 2,7		49,7 ± 0,9		48 ± 2,9		48,2 ± 3,1	
<i>Navicula jeffreyi</i>	54,3 ± 2,1		46,4 ± 1,6		56,2 ± 6,1		68,6 ± 2,9	
<i>Membrane seule</i>	44 ± 0,5		42,4 ± 1,30		49,9 ± 1,7		56,2 ± 1,8	

Dans un premier temps, on constate que les angles de contact mesurés entre les différents solvants et tapis bactériens sont significativement différents de ceux mesurés sur la membrane de filtration seule, validant ainsi la bonne application de la méthode. En comparant les valeurs obtenues d'angles de contact de l'eau avec les différents tapis bactériens, ainsi que les valeurs¹ de γ^{LW} , il est possible de déterminer le caractère hydrophile/hydrophobe des souches microbiennes (Tableau III.2-5).

Ainsi, on observe que *Lactococcus lactis* a une affinité marquée pour l'eau (AC (LL) = 21,40°, AC (HA) = 48,20° et AC (NJ) = 68,60°) et présente une valeur de γ^{LW} supérieure à celle d'*Hafnia alvei* et de *Navicula jeffreyi* (34,97 (LL) contre 32,80 (HA) et 31,80 (NJ) mJ/m²). *Lactococcus lactis* présente donc un caractère hydrophile plus marqué qu'*Hafnia alvei*, elle-même plus hydrophile que *Navicula jeffreyi*.

D'un autre côté, la comparaison des valeurs de $\bar{\gamma}$ permet de déterminer le caractère basique des souches bactériennes. On constate ainsi que *Lactococcus lactis* présente un caractère basique beaucoup plus marqué qu'*Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* (59,90 contre 38,20 contre 16,20 mJ/m²). Enfin, l'analyse des valeurs de γ^+ montre que les trois micro-organismes ne présentent pas de caractère acide significatif (< 1 mJ/m²).

La prédominance du caractère donneur d'électrons (γ^-) constitue une indication sur la nature des groupements chimiques exposés, puisque l'importance du caractère basique de Lewis a été souvent attribuée à des groupements chimiques neutres ou chargés négativement et relativement basiques, comme les groupements carboxylate (COO⁻) ou les groupements amine (NH₂) et phosphate (PO₄⁻) de phospholipides, lipoprotéines et lipopolysaccharides (Rijnaarts *et al.* 1995 ; Bellon-Fontaine *et al.* 1996 ; Rubio 2002 ; Hamadi *et al.* 2004)².

¹ γ^{LW} : reflète les énergies de surface liées aux forces d'interactions de Lifshitz-van der Waals (London, Keesom et Debye).

² La prédominance du caractère acide de Lewis est attribuée aux groupements acides comme RNH₃⁺ (Rijnaarts *et al.* 1995 ; Rubio 2002 ; Hamadi 2005).

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-5

- **Caractère hydrophobe :**
Lactococcus lactis < *Hafnia alvei* < *Navicula jeffreyi*
- **Caractère basique de Lewis :**
Lactococcus lactis > *Hafnia alvei* > *Navicula jeffreyi*
- **Caractère acide de Lewis :**
Lactococcus lactis = *Hafnia alvei* = *Navicula jeffreyi*

III.2.2.4 Méthode de partition Microbial Adhesion To Solvents (MATS)

Les résultats présentés dans cette partie (Figure III.2-12) ont été obtenus par la méthode de partition MATS et ont permis de déterminer le caractère acide/base de Lewis des souches ainsi que leur caractère hydrophile/hydrophobe respectif (Marie-Noëlle Bellon *et al.* 1996). Il est important de noter que cette technique a été développée pour des micro-organismes planctoniques. La sédimentation rapide de *Navicula jeffreyi* dans les échantillons a donc empêché toute caractérisation de ses propriétés de surface via l'utilisation de cette méthode.

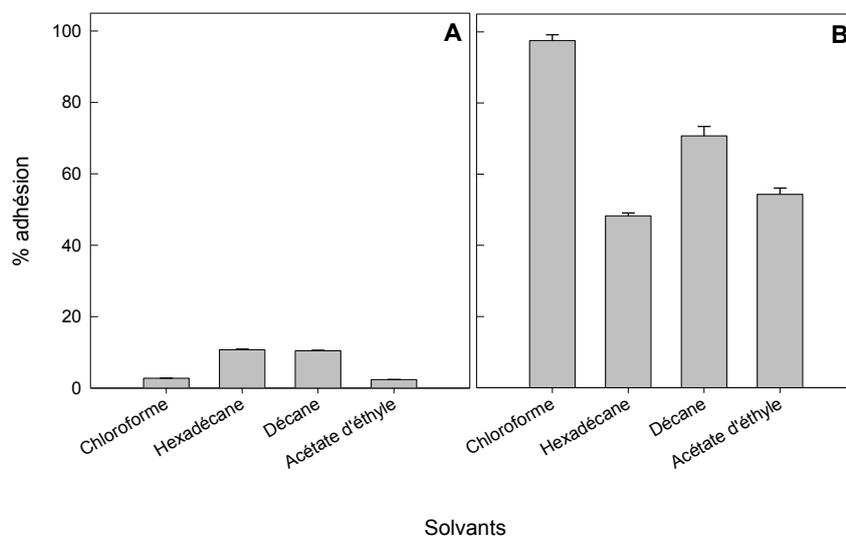


Figure III.2-12 : Pourcentages d'affinité de *Lactococcus lactis* (A) et *Hafnia alvei* (B) vis-à-vis des couples de solvants : chloroforme/hexadécane et acétate d'éthyle/décane obtenus par la méthode MATS.

Premièrement, on constate que le pourcentage d'affinité de *Lactococcus lactis* (A) pour les solvants apolaires : hexadécane et décane est faible (10 %) et que celui pour les solvants polaires : chloroforme et acétate d'éthyle est minime (1 %). La faible affinité observée pour les deux solvants apolaires (hexadécane et décane) reflète le caractère globalement hydrophile de la surface des cellules de *Lactococcus lactis*.

D'autre part, le caractère acide-base de Lewis des surfaces bactériennes est mis en évidence par l'utilisation des deux couples de solvants ayant les mêmes propriétés de Lifshitz-van de Waals : chloroforme (solvant acide, accepteur d'électrons) - hexadécane, et acétate d'éthyle (solvant basique, donneur d'électrons) - décane. La comparaison des affinités des bactéries obtenues pour les deux solvants de chaque couple n'a pas permis de réellement déterminer le caractère donneur et/ou accepteur d'électrons de *Lactococcus lactis*. En effet, on considère que la méthode MATS ne permet de déterminer le caractère acide/base de Lewis d'une souche que si cette dernière se répartit de manière franche dans les différents solvants.

L'affinité d'*Hafnia alvei* pour les solvants apolaires (hexadécane et décane) est relativement élevée (de l'ordre de 48 % et 70 % respectivement). Par ailleurs, on remarque que cette souche adhère fortement au chloroforme (pourcentage d'affinité proche de 100 %) et moyennement à l'acétate d'éthyle (pourcentage d'affinité de l'ordre de 54 %). L'affinité plus ou moins élevée d'*Hafnia alvei* pour les solvants apolaires montre un caractère hydrophobe plus marqué que pour *Lactococcus lactis*. D'autre part, l'affinité très élevée d'*Hafnia alvei* pour le chloroforme (solvant acide) par rapport à celle mesurée pour l'hexadécane montre le caractère basique de cette souche. Alors que l'affinité pour l'acétate d'éthyle est moyenne mais inférieure à celle du décane, la souche semble donc posséder un caractère très légèrement acide.

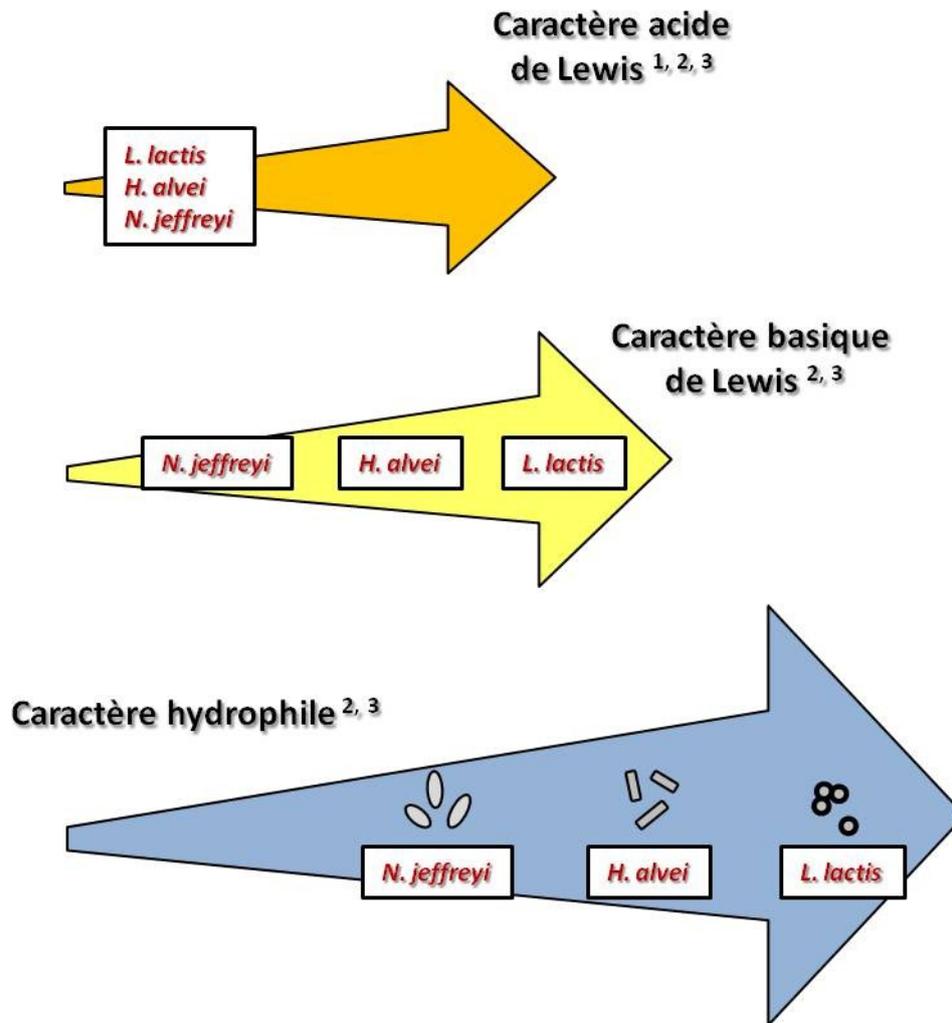
Pour conclure, la méthode MATS, appliquée à la caractérisation des propriétés de surface de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*, a montré que ces deux souches différaient de par leur affinité pour la phase aqueuse. *Hafnia alvei* semble avoir plus de facilité pour se répartir dans les solvants testés que *Lactococcus lactis*, et la différence marquée d'affinité d'*Hafnia alvei* (pourcentage de cellules adhérentes plus important) par rapport à *Lactococcus lactis* indique sans équivoque une différence de propriétés de surface de ces deux bactéries.

On suppose par ailleurs que des groupements particuliers (acides téichoïques, polysaccharides) présents à la surface de *Lactococcus lactis*, limitent de manière très significative sa répartition dans les solvants étudiés, empêchant toute détermination de ses caractéristiques acide/base de Lewis. Enfin, certains auteurs ont ainsi mis en évidence que l'adhésion des bactéries hydrophobes était généralement supérieure à celle de bactéries hydrophiles (Bruinsma *et al.* 2001 ; Gallardo-Moreno *et al.* 2002 ; Bayouhd *et al.* 2006). *Hafnia alvei*, de surface hydrophobe, présente donc une capacité d'adhésion plus importante que *Lactococcus lactis*. Cette conclusion est d'ailleurs cohérente avec les observations concernant les charges globales de surface des deux micro-organismes (*cf.* III.2.2.1, p. 222).

Cette différence d'hydrophobicité entre les deux bactéries pourrait être due à la différence de leur composition élémentaire (notamment les rapports N/C et O/C) (Boutaleb 2007). Des études ont ainsi mis en évidence que l'hydrophobicité pouvait augmenter avec le taux de protéines membranaires présentes à la surface de la bactérie étudiée. A l'inverse, la présence de composés polysaccharidiques était à l'origine d'une diminution du caractère hydrophobe (Mozes 1988 ; Rubio 2002 ; Latrache *et al.* 2002 ; Hamadi *et al.* 2004).

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-6

- **Caractère hydrophobe :**
Lactococcus lactis < *Hafnia alvei*
- **Caractère basique/acide de Lewis :**
Hafnia alvei présente une très bonne affinité aux solvants utilisés.
Lactococcus lactis se répartit difficilement dans les mêmes solvants.



¹ déterminé par micro-électrophorèse.

² déterminé par mesure des angles de contact.

³ déterminé par MATS.

Figure III.2-13 : Comparatif schématique des caractères physico-chimiques de surface des micro-organismes modèles mesurés par des méthodes classiques d'analyse de propriétés de surfaces microbiennes.

III.2.3 Détermination des propriétés de surface de micro-organismes par Chromatographie Gazeuse Inverse

La mise au point d'une nouvelle méthode, à la fois simple et précise, pour la détermination des énergies de surface de micro-organismes est décrite dans cette partie de l'étude. Jusqu'à aujourd'hui, la Chromatographie Gazeuse Inverse était réservée à l'analyse des surfaces de matériaux minéraux et de quelques polymères organiques (Levoguer *et al.* 2000 ; Comte 2004). C'est donc la première fois qu'une étude tente de caractériser les propriétés de surface de matériel vivant. Ainsi, l'analyse par CGI a pour but de déterminer les propriétés de surfaces de souches microbiennes et d'obtenir des résultats proches de ceux mesurés par des techniques classiques d'analyse (*cf. Note 3, p. 241*). La composante dispersive γ_S^D , correspondant à la capacité de la surface du solide à établir des forces de London, ou encore l'énergie d'adsorption spécifique ΔG_{ads}^{SP} , correspondant aux interactions polaires acide/base de Lewis entre les molécules sondes injectées et la surface des cellules, sont certains des paramètres majeurs qui ont été calculés au cours de cette étude via la CGI.

III.2.3.1 Mise au point de la méthode d'analyse

III.2.3.1.1 Validation du mode d'étude en Dilution Infinie

L'analyse par CGI en dilution infinie consiste en l'injection de molécules sondes en quantités très faibles afin que la quantité de molécules sondes adsorbée soit réellement proportionnelle à la surface totale de la phase stationnaire étudiée. Afin de vérifier l'application effective de ce mode de dilution, les propriétés de surface d'une souche de *Rhizobium sp.*¹ ont été analysées en utilisant deux quantités de molécules sondes² : $\frac{p}{p_0} = 0,05$ et $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

La détermination de quantité de sondes optimales à injecter pour atteindre la dilution infinie a été réalisée par comparaison des temps de rétention des différentes sondes.

¹ L'application effective de la loi d'Henry a été étudiée sur ce micro-organisme pour des raisons pratiques. En effet, il s'agissait à l'époque de la seule source de micro-organismes disponible en grande quantité au laboratoire. Les cellules de *Rhizobium sp.* ont d'ailleurs été diluées dans du Chromosorb, à hauteur de 1/1 (m/m) lors de la préparation de la phase stationnaire. Le rôle du Chromosorb était de permettre la formation d'un lit fixe homogène, au travers duquel le flux gazeux s'effectuerait correctement dans tout le volume de la colonne.

² Ordres de grandeur recommandés par les ingénieurs du système.

En effet, une bonne séparation des temps de rétention des sondes et des profils chromatographiques de qualité sont garants d'une concentration en sondes injectées suffisante à une analyse précise et répétable, reflétant de manière significative les propriétés de la surface étudiée.

Les injections du 1,4-dioxane ont été plus particulièrement observées puisqu'elles mettaient clairement en évidence des différences d'allure des spectres chromatographiques entre les deux concentrations. On cherchera à obtenir un pic fin, relativement gaussien et répétable.

On constate ainsi que les mesures des composantes dispersive et spécifique sont différentes selon les concentrations de sondes utilisées (Tableau III.2-6). Elles ne permettent pas, à elles seules, de déduire la concentration optimale de sondes à injecter pour obtenir le mode de dilution infinie.

Tableau III.2-6 : Mesure des composantes dispersive et spécifique de la surface de *Rhizobium sp.* à deux concentrations différentes en molécules sondes. Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500mg, rapport de dilution cellules/Chromosorb 1/1 (m/m).

P/P ₀	Composante dispersive de l'énergie de surface (mJ/m ² /mg)	Enthalpie libre d'adsorption spécifique (kJ/mol/mg)			
		Acétone	Chloroforme	Acétate d'éthyle	1,4-Dioxane
0,025	56,0	16,1	8,88	18,0	15,5
0,05	56,4	14,7	10,1	15,4	15,9

La Figure III.2-14 présente l'allure des pics chromatographiques obtenus après rétention du 1,4-dioxane sur le lit bactérien de *Rhizobium sp.* et ce pour les deux concentrations étudiées. On constate ainsi que la réponse à $\frac{p}{p_0} = 0,05$ est très déformée et synonyme d'une concentration en sondes trop importante. La valeur de $\frac{p}{p_0} = 0,025$ semble être optimale pour travailler en mode infini.

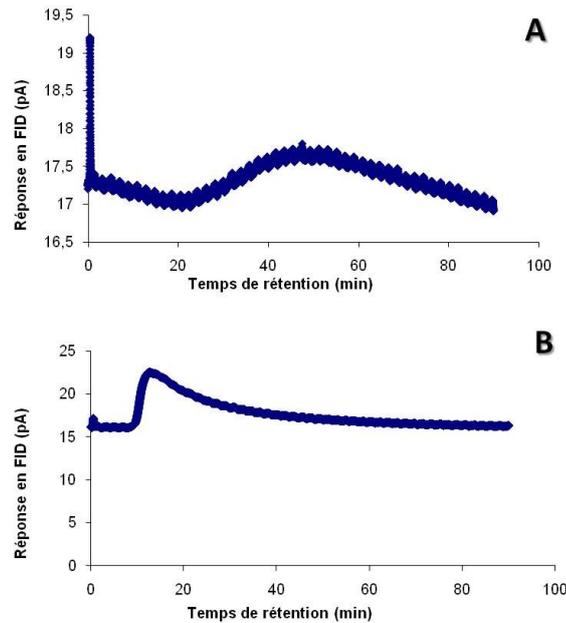


Figure III.2-14 : Allures des pics chromatographiques après rétention sur un lit bactérien de *Rhizobium* sp. du 1,4-dioxane injecté à des concentrations de (A) $\frac{p}{p_0} = 0,05$ et (B) $\frac{p}{p_0} = 0,025$. Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500 mg, rapport de dilution cellules/Chromosorb 1/1 (m/m).

III.2.3.1.2 Masse de la phase stationnaire

Bien que les mesures de composantes dispersive et spécifique soient calculées en considérant la masse du lit bactérien, la quantité de micro-organismes (dilués ou non) utilisée lors de l'élaboration de la phase stationnaire doit être prise en compte afin d'obtenir des résultats fiables et répétables. Impactant directement la hauteur du lit particulaire vertical, une masse insuffisante ne permet pas une rétention suffisante des molécules sondes et se traduit par l'obtention, pour chaque sonde, de temps de rétention trop proches. Ce phénomène a d'ailleurs été confirmé. Les résultats sont décrits en Tableau III.2-7.

Tableau III.2-7 : Variations des composantes dispersive et spécifique mesurées en fonction de différentes masses de phases stationnaires, constituées de *Rhizobium sp.* Paramètres fixes : rapport de dilution cellules/Chromosorb 1/1 (m/m), concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

Masse de la phase stationnaire (mg)	Composante dispersive de l'énergie de surface (mJ/m ² /mg)	Enthalpie libre d'adsorption spécifique (kJ/mol/mg)			
		Acétone	Chloroforme	Acétate d'éthyle	1,4-Dioxane
200	45,2	13,0	7,52	11,3	9,64
300	51,4	13,4	8,46	15,3	13,3
350	48,8	13,0	7,71	16,2	10,2
400	55,6	15,5	8,66	17,5	14,9
500	56,0	16,1	8,88	18,0	15,5

On constate ainsi que les valeurs semblent se stabiliser à partir d'une masse de la phase stationnaire de 400 mg. Eu égard à ces observations, il a donc été décidé que la masse de mélange optimale pour l'analyse en CGI serait de 500 mg¹, masse permettant d'obtenir les résultats les plus fiables.

III.2.3.1.3 Faisabilité de la méthode : optimisation

Considérant la taille des bactéries servant à élaborer la phase stationnaire, un constat simple a été posé : l'obligation de diluer ces « micro-particules » afin d'obtenir un compromis efficace entre la masse de cellules à utiliser, la pression en tête de colonne générée par la percolation du gaz sur le lit fixe de cellules et la différence nette entre les temps de rétention de différentes sondes gazeuses injectées sur la colonne. Par conséquent, les micro-organismes ont été dilués avec des supports relativement inertes, de diamètres compris entre 100 et 200 µm, afin de maintenir une pression en tête de colonne pas trop élevée, éviter la formation de chemin préférentiel du gaz et permettre une différenciation des propriétés de surface des micro-organismes modèles. L'optimisation de ces dilutions a été réalisée sur les deux bactéries modèles *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*.

¹ Les colonnes sont trop petites pour accueillir des masses supérieures à 550 mg, excluant la possibilité de tester des quantités plus importantes. En outre, cette masse génère déjà des pressions en tête de colonne importantes.

III.2.3.1.3.1 Détermination des propriétés de surface des supports seuls

Avant d'ajouter des supports aux souches bactériennes, il était indispensable d'étudier leurs propriétés de surface propres afin d'évaluer celles des mélanges supports/micro-organismes. Pour cela, le Téflon et le Chromosorb ont été observés au MEB puis leurs propriétés de surface ont été déterminées par CGI.

III.2.3.1.3.1.1 Aspect de la surface des supports par MEB

Les photographies obtenues par MEB sous vide partiel du Téflon et du Chromosorb sont présentées en Figure III.2-15.

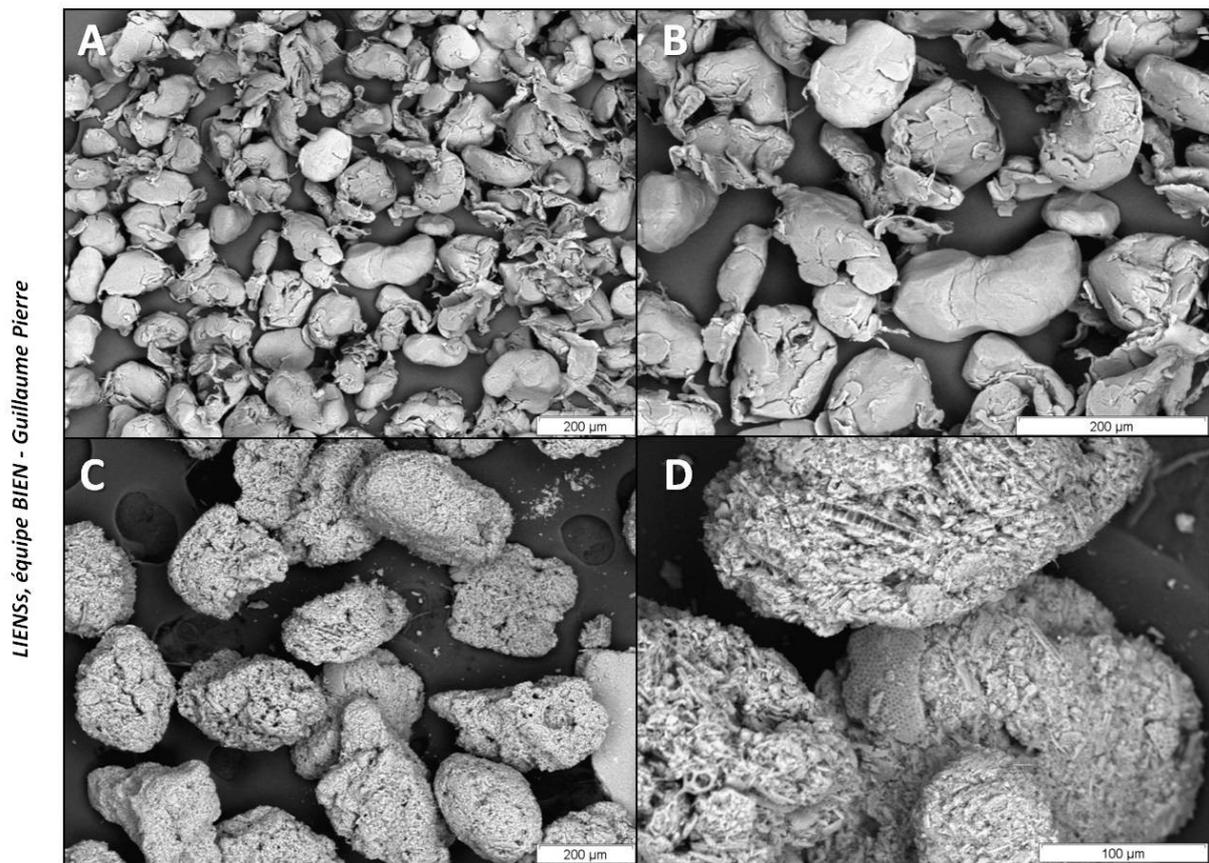


Figure III.2-15 : Photographies obtenues par MEB du (A, B) Téflon et du (C, D) Chromosorb.

On observe que chaque support présente une surface et une forme particulière spécifique. En effet, les billes de Téflon (A, B), d'une taille d'environ 100 µm, présentent une surface lisse et relativement régulière.

A l'inverse, les particules de Chromosorb (C, D), d'environ 200 μm , présentent une structure complexe et poreuse apportée par les squelettes de diatomées. L'aspect microscopique des supports permet d'espérer une bonne reproductibilité et répétabilité des analyses en CGI de part leur granulométrie relativement régulière, permettant une élaboration homogène des colonnes chromatographiques sous forme de lit fixe.

III.2.3.1.3.1.2 Propriétés de surface des supports

L'analyse par CGI des propriétés de surface des supports seuls a été menée sur 500 mg de Téflon et 550 mg de Chromosorb seuls, dans les conditions optimales décrites préalablement. Les résultats obtenus pour les deux supports sont présentés en Figure III.2-16.

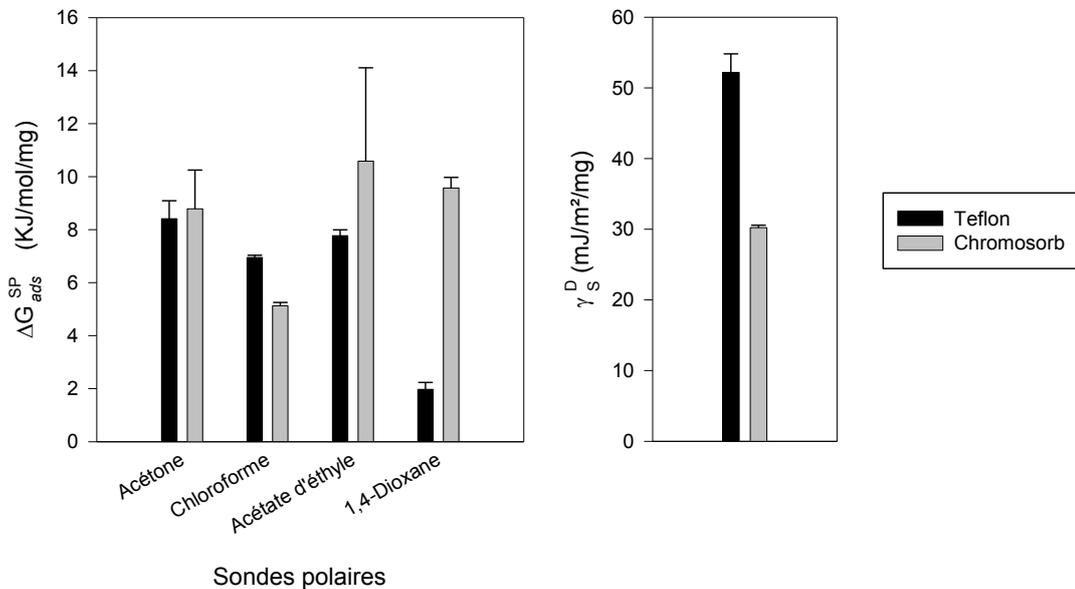


Figure III.2-16 : Enthalpies libres d'adsorption spécifique ΔG_{ads}^{SP} et composantes dispersives de l'énergie de surface γ_S^D , mesurées par CGI, du Téflon et du Chromosorb.

Dans un premier temps, on constate que les valeurs de composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^D sont plus élevées pour le Téflon que pour le Chromosorb (52 et 30 $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{mg}^{-1}$ respectivement). Cette observation indique que le Téflon est plus apte à échanger des interactions de London que le Chromosorb. Les valeurs mesurées pour ce type de Téflon sont très élevées, comparativement à de nombreuses données de la littérature.

Dans un deuxième temps, on remarque que les valeurs d'adsorption $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ entre les différentes sondes polaires et le Téflon, sont précises, reproductibles (écarts types faibles) et inférieures à celles mesurées pour le Chromosorb (à l'exception du chloroforme, présentant une valeur très légèrement supérieure). Le Téflon semble donc être relativement inerte d'un point de vue caractère acide/base de Lewis. Concernant les valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ mesurées pour le Chromosorb, les résultats montrent d'importantes interactions entre ce dernier et certaines sondes, dont notamment le 1,4-Dioxane et l'acétate d'éthyle. Cette constatation révèle clairement le caractère acide de Lewis marqué du Chromosorb, de part ses interactions fortes avec le 1,4-dioxane (sonde basique) et l'acétate d'éthyle (sonde amphotère relativement basique, DN=17,1). De plus, des écarts types plus importants ont été mesurés pour les valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ d'adsorption de l'acétate d'éthyle et de l'acétone avec le Chromosorb qu'avec le Téflon.

Face à ces observations, il a été convenu que le support Téflon permettrait uniquement de déterminer le caractère acide/base de Lewis des deux souches bactériennes puisque celui-ci est relativement inerte vis-à-vis de ce paramètre. Le support ne semble pas adapté à la mesure de la composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^{D} au vu des hautes valeurs mesurées pour ce paramètre avec le support seul. Ainsi, seuls les $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ avec les différentes sondes polaires seront analysées en présence du Téflon.

L'utilisation du Chromosorb, en raison de son faible γ_S^{D} « propre », sera quant à elle dédiée à l'analyse de la capacité des surfaces des souches microbiennes à échanger des forces de London, par la mesure de la composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^{D} des cellules mélangées à ce support.

III.2.3.1.3.2 Détermination du rapport bactéries/support

La dilution des cellules dans les deux supports choisis nécessite de déterminer la meilleure proportion entre bactéries/support lors de l'élaboration des colonnes chromatographiques. Le choix du ratio dépend de différents paramètres (pression correcte, bonne résolution entre les sondes, ...) indispensables à l'obtention de propriétés de surface des bactéries fiables et reproductibles.

III.2.3.1.3.2.1 Propriétés de surface des différents mélanges

Différentes proportions de cellules/Téflon ont été testées, et ce pour les deux souches. Les résultats sont présentés en Figure III.2-17.

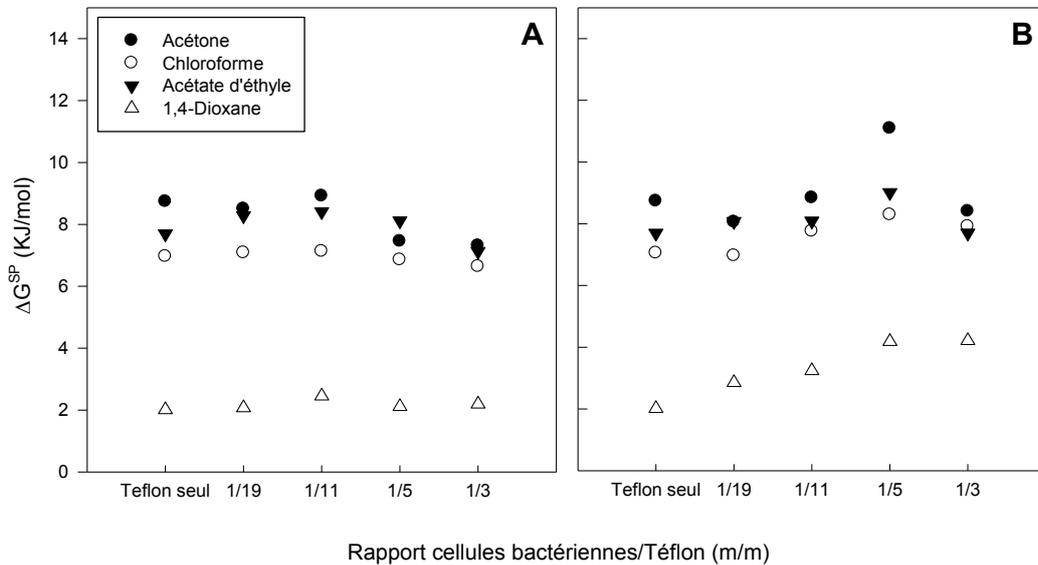


Figure III.2-17 : Evolution des enthalpies libres d'adsorption spécifique de chaque sonde polaire en fonction du rapport cellules bactériennes/Téflon utilisé dans l'élaboration des lits bactériens de *Lactococcus lactis* (A) et *Hafnia alvei* (B). Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500 mg, concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

De manière générale, il paraît indispensable de trouver un compromis entre l'utilisation non excessive du support pour limiter son effet propre sur les propriétés de surface et l'utilisation d'un ratio qui va permettre de diluer suffisamment les cellules afin de faciliter le passage des sondes à travers la colonne.

Concernant *Lactococcus lactis* (A), les valeurs de ΔG_{ads}^{SP} obtenues pour les différentes sondes polaires restent plus ou moins constantes lors de l'augmentation des proportions en Téflon dans le mélange. Une proportion de 1/5 (m/m) en *Lactococcus lactis*/Téflon, où la pression en tête de colonne est d'environ 600 torrs, permet de répondre au compromis.

Concernant *Hafnia alvei* (B), on observe une diminution des valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ mesurées pour les différentes sondes lorsque la quantité de Téflon augmente. La proportion 1/5 (m/m) entre *Hafnia alvei* et le Téflon a été choisie car elle permet d'obtenir des valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ significativement différentes de celles du support seul et permet de répondre au compromis posé.

Une analyse microscopique par MEB est venue compléter l'étude afin de valider le choix du ratio des mélanges.

III.2.3.1.3.2.2 Observation des mélanges bactéries/support (1/5, m/m) par MEB

Les photographies obtenues par MEB sous vide partiel des mélanges de bactéries avec les deux supports sont présentées dans la Figure III.2-18.

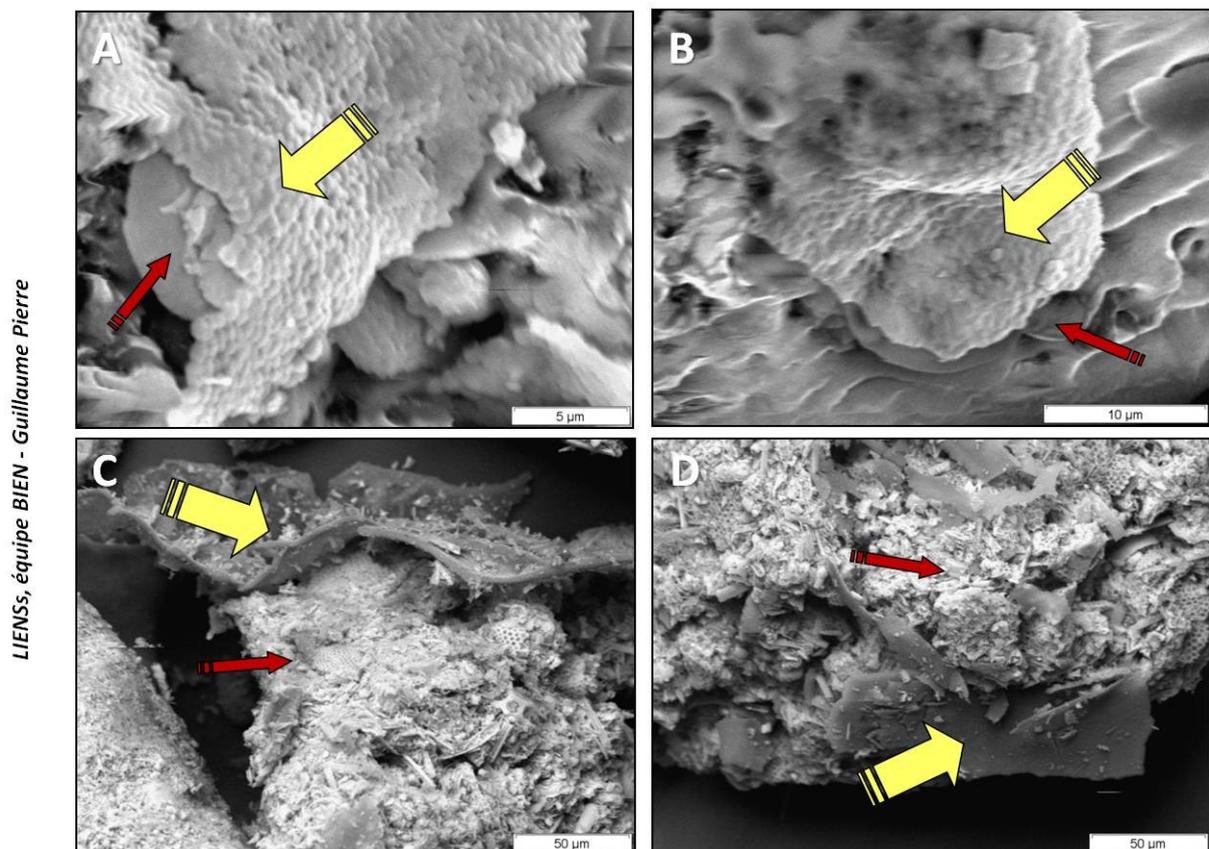


Figure III.2-18 : Photographies obtenues par MEB des ratios 1/5 (m/m) bactéries/support : (A) *Lactococcus lactis*/Téflon, (B) *Hafnia alvei*/Téflon, (C) *Lactococcus lactis*/Chromosorb et (D) *Hafnia alvei*/Chromosorb. Les flèches jaunes correspondent aux tapis bactériens. Les flèches rouges montrent le support.

On remarque que les deux bactéries, sous la forme de tapis bactériens, se répartissent à la surface des billes de Téflon (A, B) et de Chromosorb (C, D). Ces observations microscopiques témoignent du contact direct entre bactéries et support et de l'occupation d'une partie de la surface des supports par les bactéries, sous forme de tapis. Le mélange analysé constitue un lit fixe homogène. Les sondes pourront donc traverser un lit de cellules réparties d'une manière harmonieuse à la surface des billes de support.

Dans ces conditions, on peut considérer que la méthode d'analyse par CGI est applicable bien que non idéale puisque la surface des supports n'est que partiellement recouverte. Les propriétés de surface des cellules pourront être évaluées par différence avec les propriétés de surface mesurées pour les supports seuls.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-7

- *Quantité de sondes injectées $\frac{P}{P_0}$ constante égale à 0,025.*
- *Masse totale du mélange de 500 mg pour le Téflon et 550 mg pour le Chromosorb.*
- *Proportion de 1/5 entre les bactéries et le support utilisé.*
- *Le Téflon permet d'accéder à la composante spécifique de l'énergie de surface ΔG_{ads}^{SP} .*
- *Le Chromosorb est dédié à la mesure de la composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^D .*

III.2.3.2 Analyse des propriétés de surface de différents micro-organismes

Afin de déterminer les propriétés de surface des micro-organismes modèles, les conditions opératoires décrites précédemment ont été retenues.

III.2.3.2.1 Procaryotes modèles : *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*

III.2.3.2.1.1 *Evaluation du caractère acide/base de Lewis des surfaces des deux souches bactériennes Lactococcus lactis et Hafnia alvei*

Comme il l'a été expliqué précédemment (cf. III.2.3.1.3.1.2, p. 250-251), le Téflon a été utilisé pour caractériser les propriétés acide-base de Lewis de la surface des cellules. Les résultats d'enthalpie libre d'adsorption spécifique ΔG_{ads}^{SP} des différentes sondes pour le Téflon seul et les mélanges *Lactococcus lactis*/Téflon et *Hafnia alvei*/Téflon sont présentés dans la Figure III.2-19.

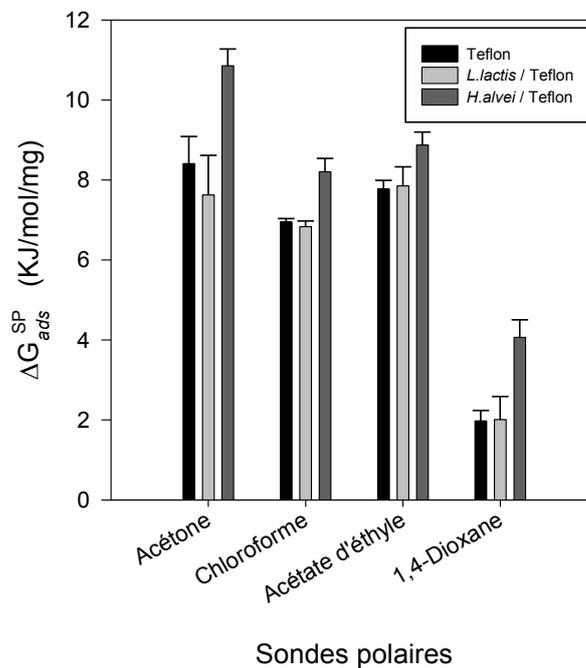


Figure III.2-19 : Enthalpies libres d'adsorption spécifiques du Téflon seul, du mélange *Lactococcus lactis*/Téflon et du mélange *Hafnia alvei*/Téflon mesurées par CGI. Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500mg, rapport de dilution cellules/Téflon 1/5 (m/m), concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

Dans un premier temps, on observe pour le mélange *Lactococcus lactis*/Téflon, des valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ proches de celles mesurées pour le support seul. On peut donc considérer que la présence de la souche *Lactococcus lactis* ne fait pas varier le caractère acide/base de Lewis du support. A l'inverse, le mélange *Hafnia alvei*/Téflon, permet d'obtenir des valeurs de $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ plus élevées, pour toutes les sondes polaires. L'augmentation du $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ pour le chloroforme, pour le mélange cellules/Téflon par rapport au Téflon seul, met en évidence le caractère basique des cellules. De même, l'augmentation du $\Delta G_{\text{ads}}^{\text{SP}}$ pour le 1,4-dioxane marque le caractère légèrement acide des cellules.

III.2.3.2.1.2 Evaluation de la capacité des surfaces bactériennes à échanger des forces de London

La composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^D reflète l'aptitude du solide étudié à échanger des forces de London. Le Chromosorb a été utilisé pour déterminer la capacité des cellules bactériennes à créer des interactions de London (cf. III.2.3.1.3.1.2, p. 248-249). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure III.2-20.

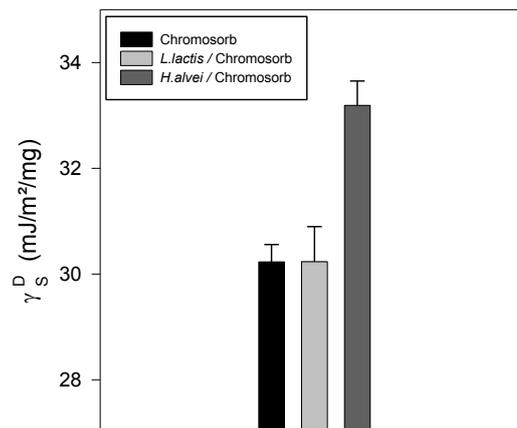


Figure III.2-20 : Composantes dispersives de l'énergie de surface du Chromosorb seul, du mélange *Lactococcus lactis*/Téflon et du mélange *Hafnia alvei*/Téflon mesurées par CGI. Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500 mg, rapport de dilution cellules/Chromosorb 1/5 (m/m), concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

Les résultats de γ_S^D observés pour le Chromosorb seul et le mélange *Lactococcus lactis*/Chromosorb sont identiques (de l'ordre de 30,2 mJ/m²). Par contre, cette composante atteint une valeur de 33,2 mJ/m² avec le mélange *Hafnia alvei*/Chromosorb. *Hafnia alvei* présente donc une capacité plus importante à échanger des forces de London.

La CGI permet de déterminer le γ_S^D du solide étudié. Plus cette valeur est importante et plus on considère la surface comme apte à échanger des forces de London. De manière générale, on considère que les forces de London sont très faibles pour des molécules polaires, en comparaison avec les autres forces intermoléculaires (interactions ioniques, force de Keesom). Ainsi, plus les forces de London sont importantes, plus on peut considérer la molécule ou la surface étudiée comme moins polaire (Tisserand 2007). Les résultats de CGI ont mis en évidence une capacité à échanger des forces de London plus importante chez *Hafnia alvei*, reflétant ainsi une surface moins polaire que *Lactococcus lactis*.

III.2.3.2.2 Modèle eucaryote : *Navicula jeffreyi*

III.2.3.2.2.1 Evaluation du caractère acide/base de Lewis de la surface de la micro-algue

Le Téflon a été utilisé pour caractériser les propriétés acide-base de Lewis de la surface des cellules de *Navicula jeffreyi*. Les résultats obtenus sont présentés en Figure III.2-21.

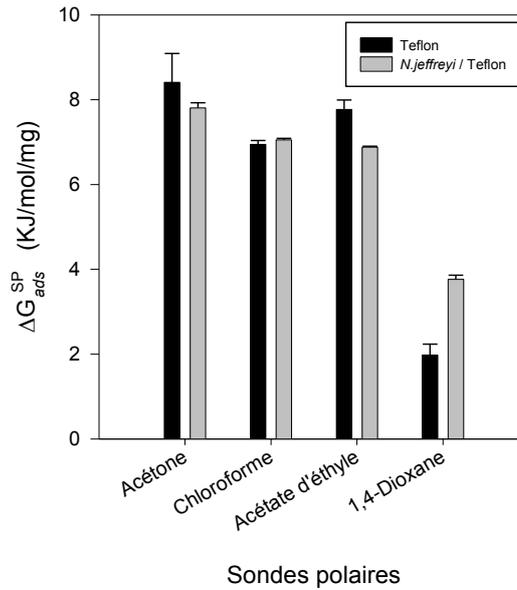


Figure III.2-21 : Enthalpies libres d'adsorption spécifiques du Téflon seul et du mélange *Navicula jeffreyi*/Téflon mesurées par CGI. Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500 mg, rapport de dilution cellules/Téflon 1/5 (m/m), concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

Dans un premier temps, on observe pour le mélange *Navicula jeffreyi*/Téflon, des valeurs de ΔG_{ads}^{SP} relativement proches de celles mesurées pour le support seul si l'on considère les sondes acétone ($AN^* = 2,5$, $DN = 17$), chloroforme ($AN^* = 5,4$) et acétate d'éthyle ($AN^* = 1,5$, $DN = 17,1$). La souche *Navicula jeffreyi* ne présente pas de caractère basique marqué (ΔG_{ads}^{SP} identique au chloroforme).

A l'inverse, la souche présente un caractère légèrement acide puisqu'elle fait varier de manière significative les valeurs d'enthalpies libres d'adsorption spécifiques avec la sonde 1,4-Dioxane. On remarque par ailleurs que son caractère acide semble être de même intensité que celui trouvé pour *Hafnia alvei* (Figure III.2-21).

III.2.3.2.2 Evaluation de la capacité de la surface de la micro-algue à échanger des forces de London

Le Chromosorb a été utilisé pour déterminer la capacité des cellules micro-algales à créer des interactions de London. Les résultats obtenus sont décrits dans la Figure III.2-22.

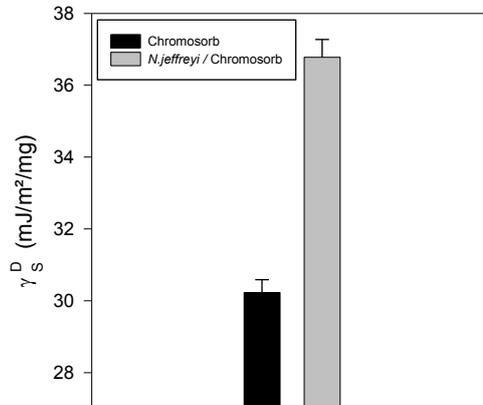


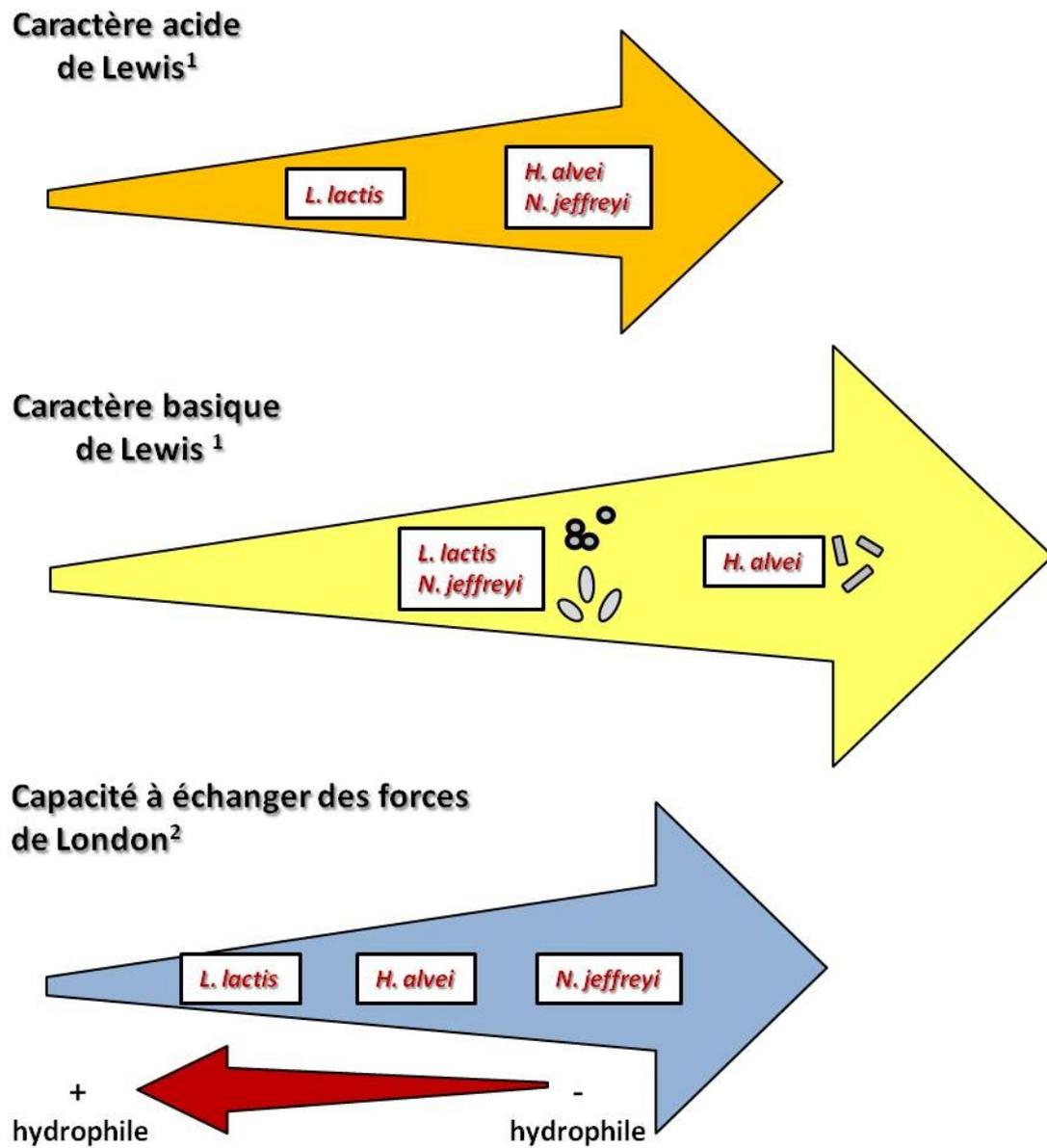
Figure III.2-22 : Composantes dispersives de l'énergie de surface du Chromosorb seul et du mélange *Navicula jeffreyi*/Téflon mesurées par CGI. Paramètres fixes : masse de la phase stationnaire de 500 mg, rapport de dilution cellules/Chromosorb 1/5 (m/m), concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

Les résultats de γ_S^D observés pour le Chromosorb seul et le mélange *Navicula jeffreyi*/Chromosorb montrent que la micro-algue est apte à échanger des forces de London, de manière significative (36,43 mJ/m²). Comparativement aux deux souches bactériennes étudiées précédemment (cf. III.2.3.2.1, p. 253-254), *Navicula jeffreyi* montre des valeurs de γ_S^D plus importantes qu'*Hafnia alvei* (33,2 mJ/m²). La différence est encore plus marquée avec *Lactococcus lactis* (30,2 mJ/m²). La surface des cellules de *Navicula jeffreyi* est donc plus apte à échanger des forces de London que celle d'*Hafnia alvei* et encore plus que *Lactococcus lactis*.

Partant de la même hypothèse corrélant la capacité à échanger des interactions de London et la polarité d'une surface, la micro-algue semble ainsi présenter le caractère le moins hydrophile (soit le moins polaire, soit le plus apte à échanger des forces de London) des trois souches étudiées.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-8

- *Capacité à échanger des forces de London :*
Lactococcus lactis < Hafnia alvei < Navicula jeffreyi
- *Caractère basique de Lewis :*
Lactococcus lactis = Navicula jeffreyi < Hafnia alvei
- *Caractère acide de Lewis :*
Lactococcus lactis < Navicula jeffreyi = Hafnia alvei



¹ déterminé par CGI avec l'utilisation de Téflon comme support de dilution.

² déterminé par CGI avec l'utilisation de Chromosorb comme support de dilution.

Figure III.2-23 : Comparatif schématique des caractères physico-chimiques de surface des micro-organismes « adhérents » mesurés par CGI.

III.2.4 La Chromatographie Gazeuse Inverse : méthode alternative ou méthode complémentaire pour la mesure des propriétés de surface de micro-organismes ?

Cette partie de l'étude s'est intéressée à déterminer si la Chromatographie Gazeuse Inverse avait le potentiel pour devenir une méthode alternative à la mesure des propriétés de surface de micro-organismes ou, plus modestement, de devenir une méthode complémentaire aux méthodes classiques utilisées, en confrontant de manière objective les résultats obtenus.

III.2.4.1 Confrontation entre les propriétés de surface des micro-organismes déterminées par CGI ou par des méthodes classiques

Concernant les méthodes classiques, la méthode MATS a montré que les surfaces de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei* différaient de par leurs affinités pour la phase aqueuse, *Lactococcus lactis* ayant la surface la plus hydrophile. La dépendance marquée d'*Hafnia alvei* pour les différents solvants a permis de mettre en évidence les caractères basique et légèrement acide de sa surface. La détermination des propriétés acide/base de Lewis de la surface de *Lactococcus lactis* n'a pu être réellement déterminée par MATS. Les mesures d'angles de contact, cohérentes avec celles de MATS, ont permis de définir et classer les caractères de chaque surface microbienne (cf. Note 3, p. 241). *Lactococcus lactis* présente la surface la plus hydrophile, suivie par celle d'*Hafnia alvei* puis de *Navicula jeffreyi*. Le caractère acide des trois souches est très proche si l'on considère les écarts-types mesurés. Enfin, *Lactococcus lactis* présente la surface la plus basique, suivie par celle d'*Hafnia alvei* puis de *Navicula jeffreyi*.

Les analyses par CGI ont également permis de définir et classer les caractères de chaque surface microbienne étudiée (cf. Note 4, p. 259). *Lactococcus lactis* présente la surface la moins apte à échanger des interactions de London (donc la plus polaire), suivie par celle d'*Hafnia alvei* puis de *Navicula jeffreyi*. Ces résultats sont cohérents avec ceux déterminés par les méthodes classiques d'analyse, puisque le même classement du caractère hydrophile des trois surfaces microbiennes a été observé. La micro-algue présente donc la surface la plus hydrophobe et donc la plus apte à générer des forces d'adhésion importantes (Jana *et al.* 2000 ; Pereira *et al.* 2000 ; Cappello *et al.* 2006).

La présence de mucilages polymériques autour de *Navicula jeffreyi*, précédemment observée par MEB (Figure III.2-3, C2) ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (cf. III.2.2.2, p. 225-226), est probablement à l'origine du phénomène. Ces SPE incluant à la fois des polysaccharides et des protéines sont probablement directement impliquées dans la capacité de la micro-algue à former des biofilms benthiques durables.

Par CGI, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* présentent des surfaces légèrement plus acides que celle de *Lactococcus lactis*. Ce classement du caractère acide de Lewis des trois surfaces microbiennes contredit partiellement les résultats obtenus par des méthodes classiques. Enfin, *Hafnia alvei* présente par CGI la surface la plus basique, suivie par celle de *Lactococcus lactis* et de *Navicula jeffreyi*. Ces résultats sont, quant à eux, contradictoires avec ceux mesurés par des techniques classiques, qui classaient la surface de *Lactococcus lactis* comme étant la plus basique au sens de Lewis.

Eu égard à ces observations, il est difficile d'apprécier si la CGI permet d'obtenir de manière fiable des résultats similaires aux techniques standards. L'état particulier des cellules bactériennes, différent pour les mesures d'angles de contact (sessile, tapis bactérien), pour la méthode MATS (planctonique, liquide) ou pour la CGI (planctonique, sec) pourrait être à l'origine de ces dissemblances. En effet, chaque méthode ne peut décrire parfaitement la contribution potentielle des interactions spécifiques puisque chacune d'elle a été développée à l'origine pour étudier l'adhésion de particules colloïdales, sphériques, micrométriques, homogènes et à l'équilibre. Premièrement, les micro-organismes sont capables de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire. Par conséquent, leurs propriétés physico-chimiques de surface sont susceptibles de varier en fonction de leur état plus ou moins adhérent ou hydraté (Boutaleb 2007). Par ailleurs, de précédents auteurs ont déjà mis en évidence le même type de contradiction entre la méthode MATS et la méthode de mesures d'angles de contact, sensées pourtant refléter toutes les deux le même caractère, à savoir l'hydrophobicité de la souche étudiée. Vanhaecke *et al.* (1990) et plus récemment Boutaleb (2007) se sont interrogés sur ce paradoxe. De manière générale, les auteurs ont conclu que l'hydrophobicité ne constituait pas le seul facteur clé de l'adhésion bactérienne aux supports. En outre, ces derniers ont attribué les différences de résultats aux caractéristiques des deux méthodes.

Les mesures d'angle de contact évaluent l'hydrophobicité de cellules bactériennes semi-hydratées et l'interaction évaluée est uniquement celle entre les molécules d'eau et les cellules bactériennes. Pour la méthode MATS, la mesure d'hydrophobicité est quant à elle réalisée sur des cellules totalement hydratées. Deux types d'interactions sont ainsi pris en compte par la méthode : une interaction entre les cellules bactériennes et l'hexadécane et l'autre entre les cellules bactériennes et l'eau.

Enfin, l'utilisation de supports de dilution lors de l'élaboration des colonnes chromatographiques a pu jouer un rôle significatif dans l'obtention de ces résultats. En effet, les micro-organismes, au cours de la préparation des phases stationnaires, s'adsorbent sur le support utilisé (Figure III.2-20). Cette adhésion réversible pourrait être à l'origine d'une modification de l'état de la surface des cellules microbiennes étudiées. Ce type de lit particulière permettrait ainsi la caractérisation des propriétés de surface de micro-organismes adhérents (même partiellement) et non de micro-organismes « libres ». Afin de confirmer ou non cette hypothèse, des études ont été menées, sur les souches bactériennes de *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei* seules, sans utiliser de support de dilution au cours de l'élaboration des colonnes chromatographiques, et ce malgré la probabilité de limitations méthodologiques (surpression en tête de colonne, formation de chemins préférentiels).

III.2.4.2 Amélioration de la méthodologie utilisée en CGI

III.2.4.2.1 Détermination des propriétés de surface de micro-organismes « libres »

Les résultats obtenus sont décrits dans la Figure III.2-24. Conformément aux observations obtenues par la méthode MATS, on constate que la surface d'*Hafnia alvei* semble plus affine aux solvants testés que celle de *Lactococcus lactis*. La souche d'*Hafnia alvei* présente un caractère basique plus marqué, visible par des valeurs de ΔG_{ads}^{SP} plus importantes pour le chloroforme (6,82 et 5,46 KJ/mol/mg respectivement). *Navicula jeffreyi* présente quant à elle un caractère basique (valeurs de ΔG_{ads}^{SP} pour le chloroforme : 8,05 KJ/mol/mg) plus marqué qu'*Hafnia alvei*.

De la même manière, les surfaces de *Navicula jeffreyi* et d'*Hafnia alvei* semblent plus acides que celle de *Lactococcus lactis*, au vu des valeurs de ΔG_{ads}^{SP} pour le 1,4-dioxane (4,15 ; 3,81 et 2,067 KJ/mol/mg respectivement). Ces conclusions sont similaires à celles obtenues via l'utilisation de support de dilution.

Par ailleurs, les valeurs de γ_S^D mesurées permettent de définir la surface de *Navicula jeffreyi* comme étant la plus apte à échanger des forces de London, suivie de la surface d'*Hafnia alvei* puis de *Lactococcus lactis*, conformément aux résultats précédents.

Le caractère basique de la micro-algue *Navicula jeffreyi* serait donc sous évalué dans le cas d'utilisation de supports de dilution par rapport à ce qu'on obtient avec les micro-algues seules. Cette différence peut être due à un effet de l'état des cellules : soit dans un état adhérent lorsque le support est présent, soit dans un état libre lorsqu'il ne l'est pas.

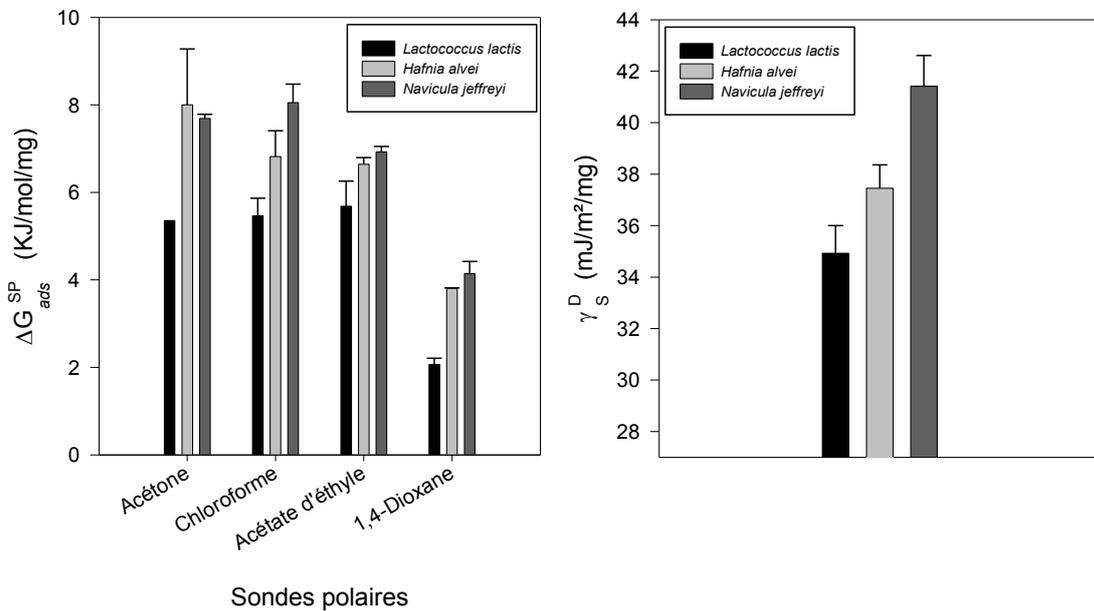


Figure III.2-24 : Enthalpies libres d'adsorption spécifiques et composantes dispersives de l'énergie de surface des micro-organismes libres *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* mesurées par CGI. Paramètres fixes : masse de cellules de 100 mg, concentration en molécules sondes $\frac{p}{p_0} = 0,025$.

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-9

- *Classement du caractère polaire des souches microbiennes par CGI identique aux méthodes d'analyse classique.*
- *Hierarchisation du caractère acide/base de Lewis différente lors de l'utilisation de la CGI.*
- *Etat des cellules bactériennes, sous forme adhérees ou libres, à prendre en considération dans la mesure des propriétés de leur surface.*

III.2.4.2.2 Détermination de différentes composantes d'énergie de surface de micro-organismes « libres »

Malgré les conclusions relativement satisfaisantes obtenues ci-dessus, il semblait intéressant de déterminer par CGI des paramètres physico-chimiques directement comparables aux énergies de surface calculées par la méthode référence de mesure d'angles de contact en comparant les composantes spécifiques γ_S^+ γ_S^- et dispersives γ_S^D . L'utilisation d'une nouvelle combinaison de molécules sondes, à savoir le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le toluène, a permis de déterminer différentes composantes de l'énergie de surface des bactéries *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* « libres » (Tableau III.2-8) :

- les composantes γ_S^+ et γ_S^- , se rapportant respectivement au caractère accepteur d'électrons (acidité) et donneur d'électrons (basicité), afin de déterminer la composante acide-base γ_S^{AB} qui tient compte des possibilités d'interactions acide/base,
- la composante dispersive de l'énergie de surface γ_S^D , reflétant l'aptitude du solide à échanger des forces de London,
- la composante totale de l'énergie de surface γ_S^t .

Tableau III.2-8 : Comparaison des énergies de surface des micro-organismes *Lactococcus lactis*, *Hafnia alvei* et *Navicula jeffreyi* déterminées (1, 2) par CGI et (3) mesures d'angles de contact. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicatas.

Souches modèles	Energies de surface (Sondes DCM/ACET) ¹				
	γ_S^- (mJ/m ²)	γ_S^+ (mJ/m ²)	γ_S^{AB} (mJ/m ²)	γ_S^d (mJ/m ²)	γ_S^t (mJ/m ²)
<i>Lactococcus lactis</i>	42,5 ± 0,8	10,9 ± 3,1	42,8 ± 6,5	34,1 ± 1,4	76,9 ± 7,8
<i>Hafnia alvei</i>	66,1 ± 4,4	11,1 ± 1,9	54,1 ± 6,5	36,5 ± 1,3	90,6 ± 3,0
<i>Navicula jeffreyi</i>	77,0 ± 3,9	13,5 ± 0,4	64,5 ± 1,6	37,5 ± 0,7	101,9 ± 2,1

Souches modèles	Energies de surface (Sondes CHL/TLN) ²				
	γ_S^- (mJ/m ²)	γ_S^+ (mJ/m ²)	γ_S^{AB} (mJ/m ²)	γ_S^d (mJ/m ²)	γ_S^t (mJ/m ²)
<i>Lactococcus lactis</i>	40,9 ± 4,5	7,9 ± 1,0	35,9 ± 4,1	34,1 ± 1,4	70,0 ± 5,5
<i>Hafnia alvei</i>	49,8 ± 1,2	15,3 ± 3,7	55,0 ± 6,1	36,5 ± 1,3	91,5 ± 4,8
<i>Navicula jeffreyi</i>	83,2 ± 1,0	22,7 ± 0,5	86,9 ± 1,5	37,5 ± 0,7	124,4 ± 2,1

Dichlorométhane (DCM), Acétate d'éthyle (ACET), Chloroforme (CHL), Toluène (TLN)

Souches modèles	Energies de surface ³				
	γ^- (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^t (mJ/m ²)
<i>Lactococcus lactis</i>	57,7 ± 5,4	0,80 ± 0,3	12,8 ± 4,3	34,5 ± 0,4	47,8 ± 4,3
<i>Hafnia alvei</i>	38,2 ± 5,6	0,60 ± 0,3	11,8 ± 4,3	32,8 ± 1,5	44,6 ± 4,5
<i>Navicula jeffreyi</i>	16,2 ± 4,9	0,35 ± 0,4	4,9 ± 3,4	31,8 ± 1,2	36,7 ± 3,7

Les résultats obtenus par CGI, cohérents avec ceux décrits précédemment (Figure III.2-24), mettent en évidence des valeurs de composantes acide/base γ_S^{AB} assez proches ($42,8 \pm 6,5$ et $54,1 \pm 6,5$ mJ.m⁻²) entre la surface des deux bactéries *Lactococcus lactis* et d'*Hafnia alvei* (sondes DCM/ACET). La surface d'*Hafnia alvei* semble cependant plus apte à échanger des interactions acide/base. Cette observation est d'autant plus vraie si l'on considère le caractère basique γ^- important de cette souche ($66,1$ ou $44,8$ mJ.m⁻² selon les sondes), en comparaison avec celui mesuré pour *Lactococcus lactis* ($42,5$ ou $40,9$ mJ.m⁻² selon les sondes).

¹ Déterminées par CGI. Application du modèle correctif de Della Volpe avec les sondes DCM/ACET.

² Déterminées par CGI. Application du modèle correctif de Della Volpe avec les sondes CHL/TLN.

³ Déterminées par mesures d'angles de contact.

Ces conclusions sont cohérentes avec les résultats obtenus par la méthode MATS qui décrivaient la souche d'*Hafnia alvei* comme plus affine avec les solvants utilisés, mais sont incompatibles avec les données obtenues par la méthode de mesure des angles de contact. En effet, les résultats de goniométrie ont permis de définir la surface de *Lactococcus lactis* comme étant la plus basique ($\gamma^- = 57,7 \text{ mJ.m}^{-2}$). *Navicula jeffreyi* apparaît comme le micro-organisme le plus apte à échanger des interactions acide/base γ_S^{AB} ($64,5 \pm 1,6 \text{ mJ.m}^{-2}$). Elle présente par ailleurs le caractère basique γ^- le plus marqué ($77 \pm 3,9$). Par ailleurs, on constate que les deux méthodes ont permis de quantifier des valeurs de composantes dispersives de l'énergie de surface γ_S^d proches. Considérant les interactions γ_S^K et γ_S^{De} comme négligeables lors des mesures d'angles de contact, la composante γ_S^{LW} reflète essentiellement les interactions dispersives γ_S^d . Ainsi, on constate que les valeurs de composantes relatives aux interactions dispersives (London) mesurées par goniométrie sont de même ordre de grandeur et assez proches pour les trois surfaces microbiennes. Les surfaces bactériennes présentent la même capacité à échanger des forces de London. Par CGI, les écarts-types observés semblent toutefois indiquer que les surfaces de *Navicula jeffreyi* et *Hafnia alvei* sont légèrement plus apte à échanger ces interactions, conformément aux résultats obtenus avec les précédentes molécules sondes utilisées. Enfin, les deux méthodes mettent en avant le caractère peu acide et identique des trois surfaces microbiennes (sondes DCM/ACET).

SYNTHESE INTERMEDIAIRE III.2-10

- ***Valeurs d'énergies de surface plus facilement comparables.***
- ***Résultats cohérents avec l'utilisation des précédentes sondes.***
- ***Différences récurrentes de la hiérarchisation du caractère acide/base de Lewis lors de l'utilisation de la CGI.***
- ***Capacité à échanger des forces de London :***
Lactococcus lactis < Hafnia alvei < Navicula jeffreyi
- ***Caractère basique de Lewis :***
Lactococcus lactis < Hafnia alvei < Navicula jeffreyi
- ***Caractère acide de Lewis :***
Lactococcus lactis < Hafnia alvei < Navicula jeffreyi

III.2.4.2.4 La CGI, une méthode complémentaire

La confrontation de l'ensemble des résultats a mis en évidence des similitudes et des dissemblances dans le classement et l'ordre de grandeur des caractères physico-chimiques obtenus par les différentes méthodes (cf. *Notes 2-5*). A l'heure actuelle, la CGI semble pouvoir apporter des indications significatives (et quantifiables) pour les mesures des propriétés de surface de cellules microbiennes. Cette nouvelle méthode permet un accès relativement facile à des composantes énergétiques de surface importantes et laisse entrevoir le potentiel réellement prometteur de la démarche. L'utilisation complémentaire de la CGI avec d'autres techniques pourrait donc permettre d'accéder à des informations supplémentaires, utiles à une meilleure définition des caractéristiques de surfaces microbiennes et à une meilleure compréhension de la capacité d'adhésion. Afin de valider intégralement le bien fondé de l'utilisation de la CGI pour la détermination des propriétés de surface de micro-organismes, il pourrait s'avérer intéressant d'affiner la ressemblance entre l'état physiologique des micro-organismes analysés par mesures d'angles de contact et par CGI. L'étude par CGI de cellules microbiennes sèches sous la forme d'un tapis homogène horizontal est l'une des perspectives majeures qui pourrait simplifier et faciliter la comparaison et la compréhension des résultats obtenus par ces deux méthodes. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'un accessoire particulier dédié à l'analyse de la surface de films fins, qui a été mis au point pour la CGI.

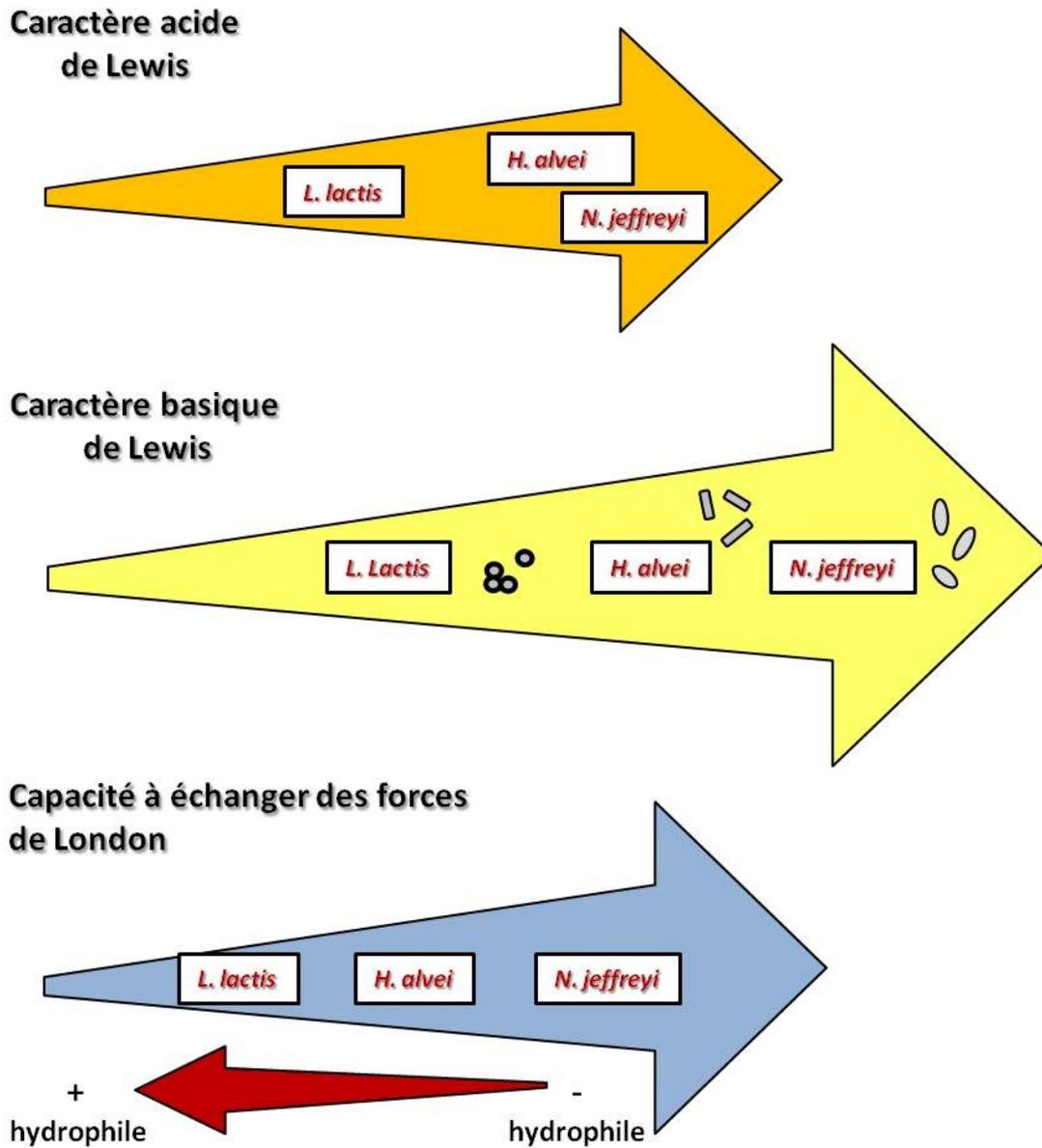


Figure III.2-25 : Comparatif schématique des caractères physico-chimiques de surface des micro-organismes « libres » mesurés par CGI.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de ce travail était de mieux comprendre l'importance des Substances Polymériques Extracellulaires dans la structuration et la formation des biofilms benthiques ; tout en s'inscrivant dans une conception plus globale des mécanismes écologiques impliqués dans le fonctionnement des vasières intertidales. Pour atteindre cet objectif, trois étapes ont été définies comme suit :

- la littérature ayant largement mis en évidence la difficulté pour extraire des quantités suffisantes de SPE et permettre leur analyse, les protocoles biochimiques ont été dans un premier temps mis au point sur l'algue verte *Chaetomorpha aerea*. Une étude préliminaire sur la composition de substances polymériques excrétées par l'algue a pu ainsi être menée en parallèle, étude qui s'inscrit dans une démarche potentielle de valorisation afin de répondre à une problématique écologique locale,
- des études biochimiques et écologiques ont été menées afin de corréliser la structure et la dynamique de production des SPE avec différentes conditions environnementales observées au sein de vasières charentaises,
- le potentiel de la Chromatographie Gazeuse Inverse, méthode alternative possible dans l'analyse des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes, a été étudié. La CGI pourrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes précurseurs à l'adhésion microbienne en s'intéressant au cas des biofilms benthiques.

Afin de standardiser les protocoles d'analyses biochimiques, *Chaetomorpha aerea* a été utilisée comme matière première riche en polymères. Ce travail préliminaire a permis d'extraire et purifier un polysaccharide sulfaté riche en galactose, CHAET#2, du mucilage de l'algue. Sa fraction saccharidique est composée de galactose (58 %), glucose (24 %), d'arabinose (18 %) et de traces de xylose. Les études menées par IRTF ont permis de classer CHAET#2 parmi des hétéropolysaccharides sulfatés comme le sulfate de dextrane ou le fucoidane. CHAET#2 a par ailleurs présenté une activité bactéricide sélective face à la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), à des concentrations élevées de 45 g/L. L'observation de cette légère activité antimicrobienne n'est cependant pas suffisante pour déterminer si une valorisation de *Chaetomorpha aerea*, macro-algue nuisible à l'activité ostréicole charentaise (Bouquet 2008), est possible.

Une étude plus longue paraît nécessaire pour corrélérer la structure du polymère avec des potentialités d'application reconnues pour des polymères algaux récoltés à partir de Chlorophycées. Dans un premier temps, il serait intéressant de caractériser, après dépolymérisation partielle ou totale (Montreuil *et al.* 1963 ; Rigouin *et al.* 2009), la structure complète du polymère via des techniques comme la CPG/SM et la Résonance Magnétique Nucléaire. Un criblage de différentes activités biologiques pourrait être proposé par la suite, en lien notamment avec des propriétés déjà reconnues aux arabinogalactanes sulfatés, ou plus généralement aux polymères sulfatés d'origine algale (Mao *et al.* 2005 ; Yoon *et al.* 2007).

La première partie des travaux, répondant aux objectifs fixés par l'Unité Mixte de Recherche du laboratoire Littoral ENvironnement et Sociétés de l'Université de La Rochelle, s'est articulée autour de l'étude des SPE excrétées durant le développement d'un biofilm microphytobenthique (Hanlon 2006) issu de sédiments intertidaux du bassin de Marennes-Oléron. Les études biochimiques et écologiques menées sur les SPE extraites de cette vasière ont mis en évidence les difficultés qu'impliquent la collecte et la séparation de différentes catégories de SPE (Pierre *et al.* 2010). La technique d'extraction utilisée *in situ* a permis pour la première fois d'étudier précisément la composition des fractions capsulaires (Takahashi *et al.* 2009). Les fractions colloïdales sont riches en polymères de bas poids moléculaire constitués essentiellement de glucose. Bien que l'étude n'ait pas permis de mettre clairement en évidence la consommation de ces dernières par les bactéries hétérotrophes du biofilm benthique, cette observation est cohérente avec la littérature (Bellinger 2009). Un marquage isotopique de ces SPE colloïdales pourrait permettre le suivi de leur incorporation chez les procaryotes bactériens (Hofmann 2009). Les glucides capsulaires présentent des répartitions en monomères, variables à très court terme durant les périodes d'émersion du sédiment. La présence de désoxy-sucres et d'acides uroniques laisse supposer que ces fractions jouent un rôle important dans la formation et le devenir du biofilm microphytobenthique, en permettant notamment l'adhésion entre les micro-algues et le sédiment. L'absence surprenante de fucose a été corrélée à l'état physiologique du biofilm et à la période de prélèvements (hiver). Par ailleurs la présence d'inositol, facteur de croissance bactérienne, dans les fractions colloïdales a été mise en évidence pour la première fois (Pierre *et al.* 2010). Les travaux présentés dans le manuscrit n'ont ciblé qu'une période environnementale de l'année. Or, de nombreux auteurs mettent en avant les variations importantes en composition et en quantité des SPE au cours de changements saisonniers (Underwood & Paterson 2003).

Une étude similaire à la précédente a ainsi été menée sur une période estivale (juillet 2008) mais sur des jeux expérimentaux beaucoup plus conséquents, puisque la dynamique des SPE benthiques a été suivie durant presque deux semaines consécutives. La totalité des tests biochimiques de cette deuxième étude a été réalisée au cours de ce travail. Les résultats obtenus sont à l'heure actuelle en cours de traitement. Les premières observations montrent déjà des disparités importantes entre les SPE produites en hiver et en été. Les substances polymériques colloïdales et capsulaires récoltées en été sont excrétées à des concentrations plus importantes et sont plus riches en protéines. Le biofilm microphytobenthique formé est plus conséquent et directement visible par les concentrations en Chlorophylle *a* mesurées dans les premiers millimètres du sédiment. La luminosité ambiante, la durée des émergences et la température de la vase semblent présenter des effets significatifs sur l'expression des SPE au sein des biofilms benthiques. Enfin, du fucose a été retrouvé dans les fractions colloïdales et capsulaires, conformément à d'autres études menées dans des conditions similaires. De manière générale, l'influence de paramètres environnementaux (hiver-été) sera étudiée méthodiquement, afin d'essayer de comprendre l'influence des conditions environnementales sur la dynamique des SPE au sein des biofilms benthiques.

Enfin, ces travaux se sont intéressés à caractériser les propriétés de surface de deux souches bactériennes modèles, *Lactococcus lactis* et *Hafnia alvei*, ainsi que de la micro-algue *Navicula jeffreyi*, intervenant dans la formation des biofilms benthiques intertidaux. La Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI), technique d'analyses des surfaces, qui n'a jamais été utilisée jusqu'ici pour déterminer les propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes. L'efficacité et le bien fondé de la méthode ont été évalués par comparaison des résultats obtenus par CGI aux résultats obtenus par des méthodes classiques, comme la mesure d'angles de contact ou la méthode MATS (Microbial Adhesion To Solvents), qui ont permis de définir et classer les caractères acide/base de Lewis et hydrophile/hydrophobe des surfaces des souches microbiennes étudiées. Dans l'ensemble, les analyses par CGI, menées sur des micro-organismes partiellement adhérents ou libres, ont permis d'obtenir des résultats relativement cohérents avec ceux obtenus par des méthodes classiques. Seules des différences majeures dans le classement du caractère basique des trois souches ont été observées. *Navicula jeffreyi* semble la plus apte à adhérer sur de multiples surfaces de part ses caractéristiques énergétiques de surface, probablement liées au mucilage de Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) qu'elle produit et dont elle s'entoure.

La présence de ces substances, en quantité et qualité différentes selon les conditions dans lesquelles se trouve la micro-algue, pourrait jouer un rôle primordial dans sa capacité à former des biofilms benthiques. Au cours de cette étude, la diatomée a été cultivée dans des conditions classiques ne favorisant pas la surproduction de ses exopolymères. Pourtant, les études menées par microscopie ont montré la présence de ces SPE (Figure Add-1). L'étude des propriétés de surface de ces mêmes micro-algues, préalablement cultivées dans des milieux contraignants (défaut de silicium, rapport carbone/azote déséquilibré), pourrait permettre de mettre en évidence le rôle probable et primordial de ces SPE dans leur capacité d'adhésion primaire.

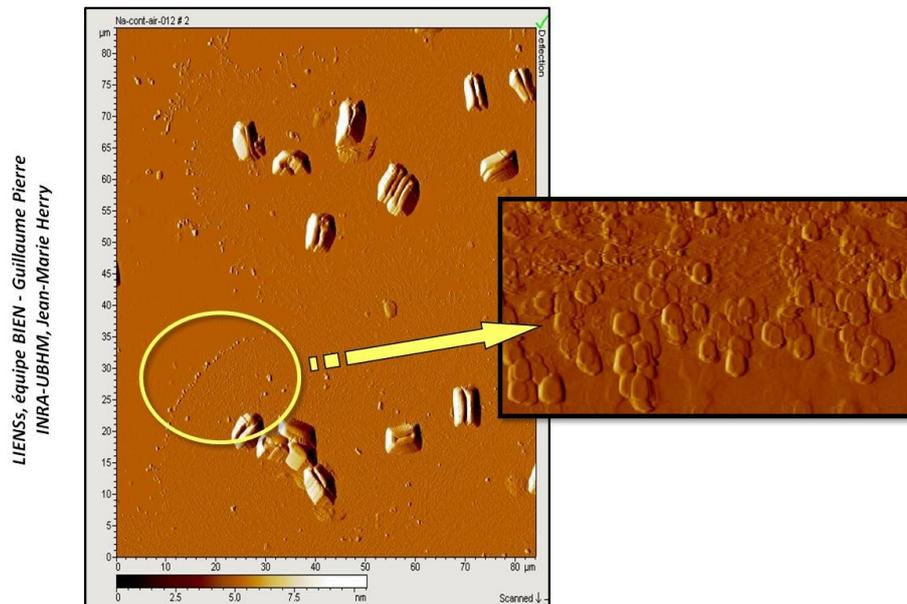


Figure Add-1 : Substances polymériques observées au sein d'un lyophilisat de Navicula jeffreyi par Microscopie à Force Atomique (mode contact, force constante et très faible).

A l'heure actuelle, la CGI semble pouvoir apporter des indications significatives et quantifiables sur les mesures des propriétés de surface de cellules microbiennes, utiles à une meilleure compréhension de leurs capacités d'adhésion. L'utilisation d'un nouveau module dédié à l'analyse de la surface de films fins par CGI, qui permet de se rapprocher de l'état physiologique des micro-organismes analysés par la méthode de référence de la mesure d'angles de contact, pourrait valider le potentiel novateur de cette méthode.



Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

LITTERATURE



Liste de Références

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A-C : p. 279-282.
- D-F : p. 282-284.
- G-I : p. 284-285.
- J-L : p. 285-287.
- M-O : p. 287-288.
- P-R : p. 288-290.
- S-U : p. 290-292.
- V-X : p. 292-293.
- Y-Z : p. 293.

AB CDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

- Abdullahi, A.S., Underwood, G.J.C., Gretz, M.R., **2006**. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. Journal of Phycology. 42, 363-378.
- Abrantes, J.L., Barbosa, J., Cavalcanti, D., Pereira, R.C., Frederico Fontes, C.L., Teixeira, V.L., Moreno Souza, T.L., Paixão, I.C.P., **2010**. The effects of the diterpenes isolated from the brazilian brown algae *Dictyota psaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. Planta Medica. 76, 339-344.
- Admiraal, W., **1984**. The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. Progress in Phycology Research. 3, 269-322.
- Al-Burtamani, S.K.S, Fatope, M.O., Marwah, R.G., Onifade, A.K., Al-Saidi, S.H., **2005**. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. Journal of Ethnopharmacology. 96, 107-112.
- Al-Haj, N.A., Mashan, N.I., Shamsudin, M.N., Mohamad, H., Vairappan, C.S., Sekawi, Z., **2009**. Antibacterial activity in marine algae *Euचेuma denticulatum* against *Stapylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Research Journal of Biological Sciences. 4, 519-524.
- Allion, A., **2004**. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides. Thèse de Doctorat, Sciences Alimentaires, Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, 188 p.
- Anand Ganesh, E., Das, S., Arun, G., Balamurugan, S., Ruban Raj, R., **2009**. Heparin like compound from green alga *Chaetomorpha antennina* – as potential anticoagulant agent. Asian Journal of Medical Sciences. 1, 114-116.
- Antoine, K.Z., Hussain, H., Dongo, E., Kouam, S.F., Schultz, B., Krohn, K., **2010**. Cameroonamide A: a new ceramide from *Helichrysum cameroonense*. Journal of Asian Natural Products Research. 12, 629-633.
- Arasaki, A., & Arasaki, T., **1983**. Low calories, high nutrition. Vegetables from the sea to help you look and feel better. Arasaki, T., & Arasaki, S. (Eds.). Japan, Tokyo, Japan Publications Inc., p. 39-42.
- Aresta, M., Dibenedetto, A., Barberio, G., **2005**. Utilization of macro-algae for enhanced CO₂ fixation and biofuels production: Development of a computing software for an LCA study. Fuel Processing Technology. 86, 1679-1693.
- Armano, H., & Noda, H., **1992**. Proteins of protoplasts from several seaweeds. Nippon Suisan Gakkaishi. 58, 291-299.
- Armbrust, E.V., **2009**. The life of diatoms in the world's oceans. Nature. 459, 185-192.
- Atkins, E.D., & Parker, K.D., **1969**. The helical structure of a beta-1,3 xylan. Journal of Polymer Science. 28, 69-81.
- Azerado, J., Henriques, M., Sillankorva, S., Oliveira, R., **2003**. Extraction of exopolymers from biofilm: the protective effect of glutaraldehyde. Water Science and Technology. 47, 175-179.
- Baba, M., Schols, D., Pauwels, R., Nakashima, H., de Clercq, E., **1990**. Sulfated polysaccharides as potent inhibitors of HIV-induced syncytium formation: a new strategy towards AIDS chemotherapy. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 3, 493-499.
- Banks, M.K., & Bryers, J.D., **1992**. Deposition of bacterial cells into glass and biofilm surfaces. Biofouling. 6, 81-86.
- Bayoudh, S., Othmane, A., Bettaieb, F., Bakhrouf, A., Ben Ouada, H., Ponsonnet, L., **2006**. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. Materials Science and Engineering. 26, 300-305.

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

- Becker, E.W., **1994**. Microalgae biotechnology and microbiology. *In*: Baddiley, J., Carey, N.H., Higgins, I.J. (Eds.) Cambridge Studies in Biotechnology, vol 10. United Kingdom, Cambridge, Cambridge University Press, 304 p.
- Becker, E.W., **2007**. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 25, 207-210.
- Belas, R., Simon, M., Silverman, M., **1986**. Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 167, 210-218.
- Bellinger, B.J., Abdullahi, A.S., Gretz, M.R., Underwood, G.J.C., **2005**. Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquatic Microbial Ecology*. 38, 169-180.
- Bellinger, B.J., Underwood, G.J.C., Ziegler, S.E., Gretz, M.R., **2009**. Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment. *Aquatic Microbial Ecology*. 55, 169-187.
- Bellon-Fontaine, M.N., Mozes, N., Van der Mei, H.C., Sjollem, J., Cerf, O., Rouxhet, P.G., Busscher, H.J., **1990**. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*. 17, 93-106.
- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J., van Oss, C.J., **1996**. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 7, 47-53.
- Bemiller, J.N., **1967**. Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 22, 25-108.
- Bertrand, A.L., **2004**. Rétention des streptocoques mutans sur des matériaux orthodontiques en fonction de différents procédés d'hygiène, Etude *in vitro*. Mémoire, Bactériologie, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 34 p.
- Bigogno, C., & Khozin-Goldberg, I., **2002**. Accumulation of arachidonic acid-rich triacylglycerols in the micro-alga *Parietochloris incisa* (*Trebuxiophyceae, Chlorophyta*). *Phytochemistry*. 60, 135-143.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G., **1973**. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 54, 484-489.
- Boisson-Vidal, C., Zemani, F., Calliguirri, G., Galy-Fauroux, I., Collic-Jouault, S., Helley, D., Fisher, A.M., **2007**. Neoangiogenesis induced by progenitor endothelial cells: effect of fucoidan from marine algae. *Cardiovascular and Hematological Agents in Medicinal Chemistry*. 5, 67-77.
- Bosgiraud, C., **2003**. Microbiologie générale et santé. *In*: Bosgiraud, C. (Eds.). France, Paris, Edition ESKA. 540 p.
- Bos, R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., **1999**. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*. 23, 179-230.
- Bouglé, D., **2007**. Peptides fonctionnels marins. *Phytothérapie*. 5, 22-26.
- Bouquet, A.L., **2008**. Limitation du développement des macro-algues en marais salé. *In*: Pillet, F. (Eds.). France, Le Château d'Oléron, Publ. Centre Régional d'Expérimentation et d'Application Aquacole, 72 p.
- Boutaleb, N., **2007**. Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de Doctorat, Chimie, Université de Bretagne-Sud, 174 p.
- Bozic, A.K., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Ricke, S.C., Callaway, T.R., Yokoyama, M.T., Wang, J.K., Nisbet, D.J., **2009**. Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin, and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation *in vitro*. *Bioresource Technology*. 100, 4017-4025.

ABC DEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

- Braud, J.P., **1998**. Simultaneous culture in pilot tanks of the macroalga *Chondrus crispus* and the microalga *Odontella aurita* producing EPA. In: IFREMER (Eds.) Marine microorganisms for industry, actes de colloque. France, Plouzané, Editions IFREMER, 21, p. 39-47.
- Bruinsma, G.M., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., **2001**. Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials*. 22, 3217-3224.
- Brendlé, E., & Papirer, E., **1998**. A new topological index for molecular probes used in inverse gas chromatography for the surface nanorugosity evaluation. i) method of evaluation. *Journal of Colloid and Interface Science*. 194, 207-216.
- Brudieux, V., **2007**. Extraction, modification enzymatique et caractérisation chimique de nouvelles structures pectiques. Application de la relation structure / activité à la dermocosmétique. Thèse de Doctorat, Chimie appliquée, chimie des substances naturelles, Université de Limoges, 223 p.
- Buckton, G., Dove, J., Davies, P., **1999**. Isothermal microcalorimetry and inverse phase gas chromatography to study small changes in powder surface properties. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 193, 13-19.
- Busscher, H. J., Bos, R., van der Mei, H.C., **1995**. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters*. 128, 229-234.
- Busscher, H.J., & Weerkamp, A.H., **1987**. Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiology Reviews*. 46, 165-173.
- Caldwell, D.E., & Lawrence, J.R., **1986**. Bacterial growth kinetics in the hydrodynamic boundary layer of solid-liquid interfaces. *Microbial Ecology*. 12, 299-312.
- Cappello, S., & Guglielmino, P.P., **2006**. Effects of growth temperature on polystyrene adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37, 205-207.
- Chakraborty, K., Lipton, A.P., Paul Raj, R., Vijayan, K.K., **2010**. Antibacterial labdane diterpenoids of *Ulva fasciata Delile* from southwestern coast of the Indian Peninsula. *Food Chemistry*. 119, 1399-1408.
- Chanzy, H., **1990**. Aspects of cellulose structure. In: Kennedy, J.F., Philips, G.O., Williams P.A. (Eds.). United States, New York, Ellis Harwood Ltd, p. 3-12.
- Characklis, W.G., Mcfeters, G.A., Marshall, K.C., **1990**. Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis, W.G., Marshall, K.C. (Eds.) *Biofilm*. United States, New York, John Wiley & Sons, p. 265-340.
- Chebil Ajjabia, L., & Choubab, L., **2009**. Biosorption of Cu²⁺ and Zn²⁺ from aqueous solutions by dried marine green macroalga *Chaetomorpha linum*. *Journal of Environmental Management*. 90, 3485-3489.
- Chevolot, L., Mulloy, B., Ratiskol, J., Foucault, A., Collicec-Jouault S., **2001**. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*. 330, 529-535.
- Chiovitti, A., Higgins, M.J., Harper, R.E., Wetherbee, R., **2003a**. The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 39, 543-554.
- Chiovitti, A., Bacic, A., Burke, J., Wetherbee, R., **2003b**. Heterogeneous xylose-rich glycans are associated with extracellular glycoproteins from the biofouling diatom *Craspedostauros australis* (bacillariophyceae). *European Journal of Phycology*. 38, 351-360.
- Christie, M.C., Dyer, K.R., Blanchard, G., Cramp, A., Mitchener, H.J., Paterson, D.M., **2000**. Temporal and spatial distributions of moisture and organic contents across a macro-tidal mudflat. *Continental Shelf Research*. 20, 1219-1242.
- Chisti, Y., **2007**. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*. 25, 294-306.

ABCD EFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

- Collic-Jouault, S., Chevolut, L., Helley, D., Ratiskom, J., Bros, A., Sinquin, C., Roger, O., Fisher A.M., **2001**. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharides produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica and Physica Acta: General Subjects*. 1528, 141-151.
- Comte, S., **2004**. Couplage de la chromatographie gazeuse inverse à un générateur d'humidité. Etude de l'hydrophilie de surface de solides divisés et des limites de la technique. Thèse de Doctorat, Génie des procédés, Institut National Polytechnique de Toulouse, 301 p.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., **2006**. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 237-245.
- Conder, J.R., & Young, C.L., **1979**. Physicochemical Measurement by Gas Chromatography. *In: John Wiley & Sons (Eds.)*. United States, New York, Chichester, Wiley-interscience, 1979, p. 632.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, G.K., **1978**. How bacteria stick? *Scientific American*. 238, 86-95.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J., **1981**. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. 35, 299-324.
- Craigie, J.S., **1990**. Cell walls. *In: Cole, K.M., & Sheath, R.G. (Eds.)* Biology of the red algae. United Kingdom, London, Cambridge University Press, p. 221-251.
- Dabouineau, L., **2004**. Un autre regard sur les algues marines. *Le Rôle d'eau*. 118, 1-4.
- Danielo, O., **2005**. Un carburant à base d'huile d'algue. *Biofutur*. 255, 33-36.
- Darcy-Vrillon, B., **1993**. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 44, S23-S35.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G., **1993**. Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59, 1181-1186.
- de Boer, J.H., & Kruyer, S., **1952**. Entropy and mobility of adsorbed molecules procedure ; atomic gases on charcoal. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*. 55, 451-463.
- de Brouwer, J.F.C., Stal, L.J., **2001**. Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Marine Ecology Progress Series*. 218, 33-44.
- de Brouwer, J.F.C., & Stal, L.J., **2004**. Does warm-water extraction of benthic diatoms yield extracellular polymeric substances or does it extract intracellular chrysolaminaran? *European Journal of Phycology*. 39, 129-131.
- Decho, A.W., **2000**. Microbial biofilms intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*. 20, 1257-1274.
- Della Volpe, C., & Siboni, S., **2000**. Acid-base surface free energy of solids and the definition of scales in the Good-van Oss-Chaudhury theory. *Journal of Adhesion Science and Technology*. 14, 235-272.
- Demirbas, O., **2010**. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. 51, 2738-2749.
- Denkhaus, E., Meisen, S., Telgheder, U., Wingender, J., **2007**. Chemical and physical methods for characterization of biofilms. *Mikrochimica Acta*. 158, 1-27.
- Derjaguin, B., & Landau, L., **1941**. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochimica*. 14, 633-662.

ABCDEF GHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ

- Dickson J.S., & Daniels, E.K., **1991**. Attachment of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* to glass as affected by surface film thickness. Cell density and bacterial motility. *Journal of Industrial Microbiology*. 8, 281-283.
- de Reviere, B., **2002**. Biologie et phylogénie des algues, tome 1 : cours. *In*: Belin (Eds.). France, Paris, Belin Sup. Sciences, 351 p.
- Donnet, J.B., Park, S.J., Balard, H., **1991**. Evaluation of specific interactions of solid surfaces by inverse gas chromatography: a new approach based on polarizability of the probes. *Chromatographia*. 31, 434-440.
- Dorris, G.M., & Gray, D.G., **1980**. Adsorption of n-alkanes at zero surface coverage on cellulose paper and wood fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 77, 353-362.
- Drago, R.S., **1965**. Physical methods in inorganic chemistry. *In*: Reinhold, V.N. (Eds.). United States, New York, Reinhold Publishing Corporation, p. 430.
- Duarte, M.E.R., Nosedá, M.D., Cardoso, M.A., Tulio, S., Cerezo, A.S., **2002**. The structure of a galactan sulfate from the red seaweed *Bostrychia montagnei*. *Carbohydrate Research*. 337, 1137-1144.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., **1956**. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356.
- Dupré, A., **1869**. Théorie Mécanique de la chaleur. *In*: Dupré, A. (Eds.). France, Paris, Gauthier-Villars, p. 367-370.
- El Kouri, A., Butel-Ponce, V., Assobhei, O., Etahiri, S., **2004**. Etude de la variation saisonnière de l'activité antimicrobienne et anti-inflammatoire chez quelques espèces d'algues marines de la côte atlantique marocaine. *Review of Biology and Biotechnology*. 3, 29-36.
- Falciatore, A., D'Alcala, M.R., Croot, P., Bowler, C., **2000**. Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science*. 288, 2363-2366.
- Filisetti-Cozzi, T.M., & Carpita, N.C., **1991**. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*. 197, 157-162.
- Flemming, H.C., & Wingender J., **2002**. Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. *In*: Bitton, G. (Eds.) *Encyclopedia of environmental microbiology*. United States, New York, Wiley, p. 1223-1231.
- Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., **2007**. The EPS matrix : the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*. 189, 7945-7947.
- Fleurence, J., **1999**. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology*. 10, 25-28.
- Fleurence, J., & Guéant, J.L., **1999**. Les algues : une nouvelle source de protéines. *Biofutur*. 19, 32-36.
- Fowkes, F.M., **1962**. Determination of interfacial tensions, contact angles, and dispersion forces in surfaces by assuming additivity of intermolecular interactions in surfaces. *Journal of physical chemistry*. 66, 382-382.
- Fowkes, F.M., **1963**. Additivity of intermolecular forces at interfaces. 1. Determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *Journal of Physical Chemistry*. 67, 2538-2541.
- Fowkes, F.M., & Mostafa, M.A., **1978**. Acid-Base interactions in polymer adsorption. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*. 17, 3-7.

ABCDEFGH IJKLMNOPQRSTUVWXYZ

- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., **1996**. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*. 30, 1749-1758.
- Fuhrman, J.A., **2009**. Microbial community structure and its functional implications. *Nature*. 459, 193-199.
- Galland-Irmouli, A.V., Fleurence, J., Lamghari, R., Luçon, M., Rouxel, C., Barbaroux, O., Bronowicki, J.P., Vuillaume, C., Guéant, J.L., **1999**. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 10, 353-359.
- Gallardo-Moreno, M., Gonzalez-Martin, M.L., Pérez-Giraldo, C., Garduno, E., Bruque, J.M., Gomez-Garcia, A.A.C., **2002**. Serum as a Factor Influencing Adhesion of *Enterococcus faecalis* to Glass and Silicone. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 5784-5787.
- Garon-Lardière, S., **2004**. Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). Thèse de doctorat, Chimie, Université de Bretagne Occidentale, 226 p.
- Gauthier, Y., & Isoard, P., **1989**. L'adhésion des bactéries sur les surfaces. *Industries alimentaires et agricoles*. 106, 31-33.
- Genestie, B., **2006**. Optimisation de la production d'arabinoxyloligosaccharides d'intérêt biologique à partir de sons de céréales : Approches méthodologiques. Thèse de Doctorat, Chimie appliquée, chimie des substances naturelles. Université de Limoges, 277 p.
- Gerschel, A., **1995**. Liaisons intermoléculaires, les forces en jeu dans la matière condensée. *In*: Bram, G., Fuchs, A., Leduc, M., Bram, G. (Eds.) *Savoirs actuels*. France, Paris, EDP Sciences, 274 p.
- Giroldo, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., **2003**. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira sp.* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*. 39, 1109-1115.
- Good, R.J., & Girifalco, L.A., **1960**. Theory for estimation of surface interfacial energies. III. Estimation of surface energy of solids from contact angle data. *Journal of Physical Chemistry*. 64, 561-565.
- Gretz, M.R., Sommerfeld, M.R., Aronson, J.M., **1982**. Cell wall composition of the generic phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). *Botanica Marina*. 25: 529-535.
- Guarini, J.M., Blanchard, G.F., Gros, P., Gouleau, D., Bacher, C., **2000**. Dynamic model of the short-term variability of microphytobenthic biomass on temperate intertidal mudflats. *Marine Ecology Progress Series*. 195, 291-303.
- Gustafson, K., **1989**. AIDS-antiviral sulfolipids from cyanobacteria. *Journal of National Cancer Institut*. 8, 1254-1258.
- Guttman, V., **1978**. The donor-acceptor approach to molecular interactions. *In*: Guttman, V. (Eds.). United States, New York, Plenum Press, 279 p.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., **2004**. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2, 95-108.
- Hamadi, F., Latrache, H., El Ghmari, A., Zahir, H., Mabrouki, M., Elbouadili, A., **2005**. Determination of *Escherichia coli* negative charge concentration from XPS data and its variation with pH. *Journal of Surface Analysis*. 12, 293-302.
- Hamadouche N., **2003**. Interactions des bactéries marines responsables de la formation des biofilms avec des matériaux biospécifiques. Thèse de Doctorat, Génie biologique et médical, Université Paris XIII, 231 p.
- Hancock, R.E.W., **1991**. Bacterial outer membranes: Evolving Concepts. *ASM News*. 57, 175-182.

ABCDEF G **HIJ** KLMNOPQRSTUVWXYZ

- Hanlon, A.R.M., Bellinger, B., Haynes, K., Xiao, G., Hofmann, T.A., Gretz, M.R., Ball, A.S., Osborn, M., Underwood, G.J.C., **2006**. Dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) production and loss in an estuarine, diatom-dominated, microbial biofilm over a tidal emersion-immersion period. *Limnology and Oceanography*. 51, 79-93.
- Haubois, A.G., Sylvestre, F., Guarini, J.M., Richard, P., Blanchard, G.F., **2005**. Spatio-temporal structure of the epipellic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 64, 385-394.
- Hayakawa, Y., Hayashi, T., Lee, J.B., Srisomporn, P., Maeda, M., Ozawa, T., Sakuragawa, N., **2000**. Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1543, 86-94.
- Haynes, K., Hofmann, T.A., Smith, C.J., Ball, A.S., Underwood, G.J.C., Osborn, A.M., **2007**. Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 6112-6124.
- Herlory, O., **2005**. Etude du biofilm microalgal des vasières intertidales : dynamique spatio-temporelle à micro-échelle et performances photosynthétiques. Thèse de Doctorat, Océanologie biologique et environnement marin, Université de La Rochelle, 204 p.
- Herruzo, F.G., Maroto, J. M. R., Delgado, R. A.G., Lahoz, C.G., Alonso, C.V., **1999**. Column study of the influence of air humidity on the retention of hydrocarbons on oil. *Chemosphere*. 41, 1167-1172.
- Hieber, V., Distler, J., Myerowitz, R., Schmickel, R.D., Jourdian, G.W., **1976**. The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of β -galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 73, 710-717.
- Hiemenz, P.C., & Rajagopalan, R., **1997**. Principles of colloid and surfaces chemistry, 3rd edition. *In*: Hiemenz, P.C., & Rajagopalan, R. (Eds.). United States, New York, CRC Press, 672 p.
- Hofmann, T., Hanlon, A.R.M., Taylor, J.D., Ball, A.S., Osborn, A.M., Underwood, G.J.C. **2009**. Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Marine Ecology Progress Series*. 379, 45-58.
- Hopkins, W.G., **2003**. Physiologie végétale. *In*: Hopkins, W.G. (Eds.). Belgique, Bruxelles, De Boeck Université, 512 p.
- Indegaard, M., & Minsaas, J., **1991**. Animal and human nutrition. *In*: Guiry, M.D., & Blunden, G. (Eds.) *Seaweed resources in Europe. Uses and potential*. United Kingdom, Chichester, John Wiley & Sons, p. 21-64.
- Iriki, Y., Suzuki, T., Nisizawa, K., Miwa, T., **1960**. Xylan of siphonaceous green algae. *Nature*. 187, 82-83.
- Jaques, L.B., Ballieux, R.E, Dietrich, C.P., Kavanagh, L.W., **1968**. A microelectrophoresis method for heparin. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 46, 351-360.
- Jahn, W., Steinbeiss, J., Zetsche, K., **1984**. Light intensity adaptation of phycobiliprotein content of the red alga *Porphyridium*. *Planta*. 161, 536-539.
- James, A.M., **1991**. Charge properties of microbial cell surfaces. *In*: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., Rouxhet, P.G. (Eds.) *Microbial cell surface analysis. Structural and physicochemical methods*. United States, New York, VCH Publishers, p. 221-262.
- James, A.T., & Martin, J.P., **1952**. Gas-liquid partition chromatography : the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochemical Journal*. 50, 679-690.

ABCDEFGHI**J**KL MNOPQRSTUVWXYZ

- Jana, T.K., Srivastava, A.K., Csery, K., Arora, D.K., **2000**. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in nonspecific adhesion. *Canadian Journal of Microbiology*. 46, 28–37.
- Jefferson, K.K., **2004**. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 236, 163-173.
- John, D.M., **1994**. Biodiversity and conservation: an algal perspective. *The Phycologist*. 38, 5-15.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A., **2011**. Micro and macro algae biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 102, 186-193.
- Kamerling, J.P., Gerwig, G.J., Vliegenthart, J.F., Clamp, J.R. **1975**. Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl méthylglycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*. 151, 491-495.
- Kaoru, T., **1998**. Surface activity: principles, phenomena and applications. *Interfaces and Biomaterials*. 2, 244-245.
- Kazayawoko, M., Balatinecz, J.J., Romansky, M., **1997**. Thermodynamics of adsorption of n-alkanes on maleated wood fibers by inverse gas chromatography. *Journal of Colloid and Interface Science*. 190, 408-415.
- Keirsse, J., **2003**. Spectroscopie infrarouge déportée : mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique. Thèse de Doctorat, Structures et propriétés de la matière, Université de Rennes I, 123p.
- Kemball, C., & Rideal, E.K., **1946**. The adsorption of vapours on mercury non-polar substances. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*. 187, 53-73.
- Kloareg, B., Demarty, M., Mabeau, S., **1986**. Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae. *International Journal of Biological Macromolecules*. 8, 380-386.
- Kloareg, B., & Quatrano, R.S., **1988**. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology: Annual Review*. 26, 259-315.
- Kolanjinathan, K., Ganesh, P., Govindarajan, M., **2009**. Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 13, 173-177.
- Kornprobst, J.M., **2005**. Substances naturelles d'origine marine : chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. *In: Kornprobst, J.M (Eds.)*. France, Paris, Tec & Doc, 1830 p.
- Ktari, L., Ismail-Ben Ali, A., Ben Redjem, Y., Langar, H., El Bour, M., **2010**. Antifouling activity and chemical investigation of the brown alga *Dictyota fasciola* (Dictyotales) from Tunisian coast. *Cahiers de Biologie Marine*. 51, 109-115.
- Kützing, F.T., **1843**. *Phycologia generalis oder anatomie, physiologie und systemkunde der tange*. *In: Brockhaus F.A. (Eds.)*. Germany, Leipzig, F.A. Brockhaus, 457 p.
- Lahaye, M., **2001**. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *Journal of Applied Phycology*. 13, 173-184.
- Lahaye, E., **2006**. Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien. Thèse de Doctorat, Biologie, Université de Bretagne-Sud, 148p.
- Lamouroux, J.V.F., **1813**. Essai sur les genres de la famille des Thalassiphytes non articulées. *In: Dufour, C. (Eds.)*. France, Paris, Annales du Muséum d'Histoire naturelle, 84 p.

ABCDEFGHIJK**LM**NOPQRSTUVWXYZ

- Langumier, M., Sabot, R., Obame-Ndong, R., Jeannin, M., Sable, S., Refait, Ph., **2009**. Formation of Fe(III)-containing mackinawite from hydroxysulphate green rust by sulphatereducing bacteria. *Corrosion Science*. 51, 2694-2702.
- Larpent, J.P., & Larpent-Gourgaud, M., **1985**. Eléments de microbiologie. *In*: Larpent, J.P., Larpent-Gourgaud, M. (Eds.) Collection Enseignement des sciences, vol 34. France, Paris, Hermann, p. 985.
- Latrache, H., Moses, N., Pelletier, C., Bourlioux, P., **1994**. Chemical and physicochemical properties on *Escherichia coli*: Variations among three strains and influence of culture conditions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2, 47-56.
- Levoguer, C., Butler, D., Thielmann, F., Williams, D., **2000**. Characterizing the physico-chemical properties of pharmaceutical materials. *Pharmaceutical Technology Europe*. 12, 36-42.
- Lorenzen, S., **1966**. A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Research*. 13, 223-227.
- Luppens, S.B.I, Reij, M.W., van der Heijden, R.W.L., Rombouts, F.M., Abee, T., **2002**. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 4194-4200.
- Macguire, J., & Krisdhasirna, V., **1992**. Surface thermodynamics, protein adsorption and biofilm development. *In*: Schartzberg, H.G., Wartel R.W. (Eds.) *Physical Chemistry of Food*. United States, New York, Marcel Dekker, 747 p.
- Malainine, M.E., **2007**. Une arabinogalactane protéine ayant la propriété d'absorber les graisses et le procédé d'obtention de cette arabinogalactane protéine. Maroc, Marrakech, Université Cadi Ayyad, Brevet WO 2007/100236 A2
- Mandal, P., Pujol, C.A., Carlucci, M.J., Chattopadhyay, K., Damonte, E.B., Bimalendu, R., **2007**. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. *Phytochemistry*. 69, 2193-2199.
- Mao, W., Zang, X., Li, Y., Zhang, H., **2005**. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology*. 18, 9-14.
- Marfaing, H., & Lerat, Y., **2007**. Les algues ont-elles une place en nutrition ? *Phytothérapie*. Numéro Hors-Série, HS2-HS5.
- Marshall, K.C., **1986**. Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*. 25, 59-86.
- Mauray, S., Sternberg, C., Theveniaux, J., Millet, J., Siquin, C., Tapon-Brethaudiere, J., Fisher, A., **1995**. Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction. *Thrombosis and Haemostasis*. 74, 1280-1285.
- Mc Hugh, D.J., **2003**. A guide to the seaweed industry, T441. *In*: FAO Fisheries Technical Paper (Eds.). Italia, Rome, FAO Fisheries Department & FAO Regional Fisheries Officers, 118p.
- Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Sick, G., Stracker, G., **1986**. Glycoproteins. *In*: Chaplin, M.F., Kennedy, J.K. (Eds.) *Carbohydrate analysis : a practical approach*. United Kingdom, Oxford, Oxford IRL Press, p. 143-204.
- Montreuil, J., Spick, G., Chosson, A., Segard, E., Scheppler, N., **1963**. Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 18, 529-546.
- Mozes, N., Léonard A.J., Rouxhet, P.G., **1988**. On the relations between the elemental surface composition of yeasts and bacteria and their charge and hydrophobicity. *Biochimica and Biophysica Acta*. 945, 324-334.

ABCDEFGHIJKLMN**OP**QRSTUVWXYZ

- Mukhopadhyay, P., & Schreiber, H.P., **1995**. Aspects of acid-base interactions and use of inverse gas chromatography. *Colloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 100, 47-71.
- Muller-Feuga, A., **1997**. Microalgues marines, les enjeux de la recherche. *In: Barbier, G., Baud, J.P., Blancheton, J.P., Durand, P., Gentien, P., Hervé, A., Hussenot, J., Lassus, P., Nicolas, J.L., Robert, R., Robin, J., Roy, P., Samain, J.F., Baudimant, G., Bergé, J.P., Berland, B., Divanach, P., Dubacq, J.P., Lissolo, T., Largeau, C., Robert, J.M. (Eds.). France, Plouzané, Editions IFREMER, 35 p.*
- Mulloy, B., **2005**. The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *Anais de Academia Brasileira de Ciências*. 77, 651-664
- Nakajima, K., Yokoyama, A., Nakajima, Y., **2009**. Anticancer effects of a tertiary sulfonium compound, dimethylsulfoniopropionate, in green sea algae on Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 55, 434-438.
- Nardella, A., Chaubet, F., Boisson-Vidal, C., Blondin, C., Durand, P., Jozefonvicz, J., **1996**. Anticoagulent low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucanes extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*. 289, 201-208.
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M., **1994**. Physiologie de la cellule bactérienne : une approche moléculaire. *In: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. (Eds.). France, Paris, Masson, 487 p.*
- Neumann, A.W., Good, R.J., Hope, C.J., Sejpal, M.J., **1974**. An equation-of-state approach to determine surface tensions of low-energy solids from contact angles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 49, 291-304.
- Nirmal Kumar, J.I., Kumar, R.N., Amb, M.K., Bora, A., Kraborty, S., **2010**. Variation of biochemical composition of eighteen marine macroalgae collected from Okha Coast, Gulf of Kutch, India. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 9, 404-410.
- Oliveira, D.R., **1992**. Physico-chemical aspects of adhesion. *In: Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.) Biofilms - Science and Technology. The Netherland, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 45-58.*
- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G., Sauriau, P.G., **2003**. Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial Ecology*. 45, 237-251.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R., **2000**. Review: biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 54, 49-79.
- Owens, D.K., & Wendt, R.C., **1969**. Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*. 13, 1741-1747.
- Paterson, D.M., & Black, K.S. **1999**. Water flow, sediment dynamics and benthic biology. *Advances in Ecological Research*. 29, 155-193.
- Patil, J.S., & Anil, A.C., **2005**. Biofilm diatom community structure: influence of temporal substratum variability. *Biofouling*. 21, 189-206.
- Pelletier, C., **1997**. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1725-1731.
- Percival, E., & McDowel, R., **1967**. Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides. *In: Percival, E., & McDowel, R. (Eds.). United Kingdom, London, Academic Press, 219p.*
- Percival, E., **1979**. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *British Phycological Journal*. 14, 103-117.

ABCDEFGHIJKLMNO **PQR** STUVWXYZ

- Pérez, R., **1997**. Ces algues qui nous entourent. *In*: Arbault, S., Barbaroux, O., Phliponeau, P., Rouxel, C. (Eds.). France, Plouzané, Editions IFREMER, 272 p.
- Pereira, M.A., Alves, M.M., Azeredo, J., Mota, M., Oliveira, R., **2000**. Influence of physicochemical properties of porous microcarriers on the adhesion of an anaerobic consortium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 24, 181-186.
- Perkins, R.G., Paterson, D.M., Sun, H., Watson, J., Player, M.A., **2004**. Extracellular polymeric substances: quantification and use in erosion experiments. *Continental Shelf Research*. 24, 1623-1635.
- Pierre, G., Graber, M., Orvain, F., Dupuy, C., Maugard, T., **2010**. Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochemical Systematics and Ecology*. In press, doi:10.1016/j.bse.2010.09.014.
- Planinsek, O., Zadnik, J., Rozman, S., Kunaver, M., Srcic, S., **2003**. Influence of Inverse Gas Chromatography measurement conditions, *International Journal of Pharmaceutics*. 256, 17-23.
- Ponce, N.M.A., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Flores, M.L., Stortz, C.A., **2003**. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research*. 338, 153-165.
- Porter, K.G., & Feig, Y.S., **1980**. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*. 25, 943-948.
- Preston, R.D., **1974**. Physical biology of plant cell walls. *In*: Chapman & Hall (Eds.). United States, New York, Halsted Press, 491p.
- Queiroz, K.C.S., Medeiros, V.P., Queiroz, L.S., Abreu, L.R.D., Rocha, H.A.O., Ferreira, C.V., Juca, M.B., Aoyama, H., Leite, E.L., **2008**. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 62, 303-307.
- Radmer, R.J., & Parker, B.C., **1994**. Commercial application of algae: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*. 6, 93-98.
- Ray, B., & Lahaye, M., **1995**. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva "rigida"* (Ulvales, Chlorophyta). Extraction and chemical composition. *Carbohydrate Research*. 274, 251-261.
- Richards, J.T., Kern, E.R., Glasgow, L.A., Overall, J.C. Jr., Deign, E.F, Hatch, M.T., **1978**. Antiviral activity of extracts from marine algae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 14, 24-30.
- Riganakos, K.A., Demertzis, P.G., Kontominas, M.G., **1993**. Water sorption by wheat and soy flour : comparison of three methods. *Journal of Cereal Science*. 20, 101-106.
- Rigouin, C., Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Collic-Jouault, S., Dion, M., **2009**. Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydrates Polymers*. 76, 279-284.
- Rijnaarts, H., Norde, W., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., **1995**. The isoelectric point of bacteria as an indicator for the presence of cell surface polymers that inhibit adhesion. *Colloids and Surface B : Biointerface*, 1995. 4, 191-197.
- Rincé, Y., Lebeau, T., Robert, J.M., **1999**. Artificial cell-immobilization : a model simulating immobilization in natural environments ? *Journal of Applied Phycology*. 11, 263-272.
- Robert, D., & Catesson, A.M., **2000**. Organisation végétative. *In*: Robert, D., & Catesson, A.M. (Eds.) *Biologie Végétale*, vol 2. France, Paris, Doin Editeurs, p. 75-95.

ABCDEFGHIJKLMN**OPQRS**TUVWXYZ

- Roger O., **2002**. Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. Thèse de doctorat, Chimie des biomatériaux, Université de Paris XIII, 195 p.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E., **1980**. Adherence of bacteria to hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters*. 9, 29-33.
- Rossano, R., Ungaro, N., D'Ambrosio A., Liuzzi G.M., Riccio P., **2003**. Extracting and purifying R-phycoerythrin from Mediterranean red algae *Corallina elongate Ellis & Solander*. *Journal of Biotechnology*. 101, 289-293.
- Rouessac, F., & Rouessac, A., **1994**. Analyse chimique, méthodes et techniques instrumentales modernes, 2^{ème} édition. *In: Rouessac, F., & Rouessac, A. (Eds.)*. France, Paris, Masson, 306 p.
- Rouquerol, F., Rouquerol, J., Sing, K., **1999**. Adsorption by powders and porous solids. *In: Rouquerol, F., Rouquerol, J., Sing, K. (Eds.)*. United Kingdom, London, Academic Press, 467p.
- Rubio, C., **2002**. Compréhension des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de Doctorat, Métallurgie et matériaux, Université de Paris VI, 214p.
- Ruiz, G., **2005**. Extraction, détermination structurale et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de doctorat, Chimie appliquée et chimie des substances naturelles, Université de Limoges, 230 p.
- Rupérez, P., & Saura-Calixto, F., **2001**. Dietary fibre and physicochemical properties of edible Spanish seaweeds. *European Food Research and Technology*. 212, 349-354.
- Rutter, P.R., & Vincent, B., **1980**. The adhesion of microorganisms to surfaces: physic-chemical aspects. *In: Berkeley, R.C.W., Lynch, J.M., Melling, J., Rutter, P.R., Vincent, B. (Eds.)* Proceedings, Microbial Adhesion to Surfaces. United Kingdom, Chichester, Ellis Horwood Ltd, p. 79-92.
- Saint Flour, C., & Papirer, E., **1982**. Gas-solid chromatography. A method of measuring surface free energy characteristics of short glass fibers through retention volumes measured near zero surface coverage. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*. 21, 666-669.
- Santos, M.G.M., Lagrota, M.H.C., Miranda, M.M.F.S., Yoneshigue-Valentin, Y., Wiggdoi, M.D., **1999**. A screening for the antiviral effect of extracts from Brazilian marine algae against acyclovir resistant Herpes Simplex Virus Type 1. *Botanica marina*. 44, 227-230.
- Satou, J., Fukunaga, A., Satou, N., Shintani, H., Okuda, K., **1988**. Streptococcal adherence on various restorative materials. *Journal of Dental Research*. 67 588-591.
- Schultz, J., Lavielle, L., Martin, C., **1987**. Propriétés de surface des fibres de carbone déterminées par chromatographie gazeuse inverse. *Journal de Chimie Physique*. 84, 231-237.
- Schwarzmann, S., & Boring, J.R., **1971**. Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. 3, 762-767.
- Selvin, J., & Lipton, A.P., **2004**. Biopotentials of *Ulva fasciata* and *Hypnea musciformis* collected from the Peninsular Coast of India. *Journal of Marine Science Technology*. 12, 1-6.
- Smayda, T.J., **1997**. Bloom dynamics: physiology, behavior, trophic effects. *Limnology and Oceanography*. 42, 1132-1136.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., **1987**. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150, 76-85.

ABCDEFGHIJKLMN**OPQR****ST**UVWXYZ

- Smith, D.J., & Underwood, G.J.C., **1998**. Exopolymers production by intertidal epipellic diatoms. *Limnology and Oceanography*. 43, 1578-1591.
- Souhaili, N., Lagzouli, M., Faid, M., Fellat-Zerrouch, K., **2004**. Inhibition of growth and mycotoxins formation in moulds by marine algae *Cystoseira tamariscifolia*. *African Journal of Biotechnology*. 3, 71-75.
- Spears, B.M., Saunders, J.E., Davidson, I., Paterson, D.M., **2008**. Microalgal sediment biostabilisation along a salinity gradient in the Eden Estuary, Scotland: unraveling a paradox. *Marine and Freshwater Research*. 59, 313-321.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., **2006**. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 101, 87-96.
- Staats, N., de Winder, B., Stal, L.J., Mur, L.R., **1999**. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology*. 34, 161-169.
- Staats, N., Stal, L.J., Mur, L.R., **2000**. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 249, 13-27.
- Stal, L.J., **2003**. Microphytobenthos, their extracellular polymeric substances, and the morphogenesis of intertidal sediments. *Geomicrobiology Journal*. 20, 463-478.
- Stal, L.J., & Défarge, C., **2005**. Structure and dynamics of exopolymers in an intertidal diatom biofilm. *Geomicrobiology Journal*. 22, 341-352.
- Stanley, N.R., Britton, R.A., Grossman, A.D., Lazazzera, B.A., **2003**. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by the use of DNA microarrays. *Journal of Bacteriology*. 185, 1951-1957.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., **2002**. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*. 56, 187-209.
- Sutherland, I.W., **1982**. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in microbial physiology*. 23, 79-150.
- Sutherland, I.W., **1996**. Extracellular Polysaccharides. *In: Rehm, H.J. & Reed, G. (Eds.) Biotechnology*, vol 6. Germany, Weinheim, Verlag Chemie, 615-657.
- Sutherland, I.W., **2001**. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 147, 3-9.
- Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., Orvain, F., **2009**. Optimizing extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Marine and Freshwater Research*. 60, 1201-1210.
- Taylor, I.S., Paterson, D.M., Mehlert, A., **1999**. The quantitative variability and monosaccharide composition of sediment carbohydrates associated with intertidal diatom assemblages. *Biogeochemistry*. 45, 303-327.
- Thornton, D.C.O., Dong, L.F., Underwood, G.J.C., Nedwell, D.B., **2002**. Factors affecting microphytobenthic biomass, species composition and production in the Colne Estuary (UK). *Aquatic Microbial Ecology*. 27, 285-300.
- Timell, T.E., Enterman, W., Spencer, F., Soltes, E.J., **1965**. The acid hydrolysis of glycosides. II. effect of substituents at C-5. *Canadian Journal of Chemistry*. 43, 2296-2305.
- Tisserand, C., **2007**. Etude par chromatographie gazeuse inverse des propriétés de surface de deux formes cristallographiques d'alumines : influence de différents paramètres tels l'humidité ou le dopage en magnésie. Thèse de Doctorat, Génie des procédés et environnement, Institut National Polytechnique de Toulouse, 201 p.

ABCDEFGHIJKLMNOPS **TUV** WXYZ

- Tolker-Nielsen, T., & Moblin, S., **2000**. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*. 40, 75-84.
- Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., **2004**. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology*. 40, 293-304.
- Underwood, G.J.C., & Kromkamp, J., **1999**. Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Advances in Ecological Research*. 29, 93-153.
- Underwood, G.J.C., & Paterson, D.M., **2003**. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipellic diatoms. *Advances in Botanical Research*. 40, 184-240.
- Underwood, G.J.C., Paterson, D.M., Parkes, R.J., **1995**. The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnology and Oceanography*. 40, 1243-1253.
- Underwood, G.J.C., & Smith, D.J., **1998**. Predicting epipellic diatom exopolymer concentrations in intertidal sediments from sediment chl. *a*. *Microbial Ecology*. 35, 116-125.
- Usov, A.I., & Klochkova, N.G., **1992**. Polysaccharides of algae 45. Polysaccharide composition of red seaweeds from Kamchatka coastal water (north western pacific) studied by reductive hydrolysis of biomass. *Botanica Marina*. 35, 371-378.
- Usov, A.I., **1998**. Structural analysis of red seaweed galactanes of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids*. 12, 301-308.
- Valiela, I., McClelland, J., Hauxwell, J., Behr, P.J., Hersh, D., Foreman, K., **1997**. Macroalgal blooms in shallow estuaries: Controls and ecophysiological and ecosystem consequences. *Limnology and Oceanography*. 42, 1105-1118.
- Valt, A., **2008**. Etude de deux procédés de polymérisation d'un précurseur gazeux dans un plasma radiofréquence basse pression et liquide déposé sur un substrat activé par décharge à barrière diélectrique à pression atmosphérique : application aux propriétés antifouling. Thèse de Doctorat, Génie des procédés et technologies avancées, Université Pierre et Marie Curie, 233 p.
- van der Mei, H.C., **1989**. Physico-chemical surface properties of oral streptococci. *In*: Arends, J., Rouxhet, P.G., Busscher, H.J., Weerkamp, A.H., Feijen, J., Prins, R.A., Sawatzky, G.A. (Eds.). *The Netherland, Drachten, Krips Repro Meppel*, 159 p.
- van der Mei, H.C., Rosenberg, M., Busscher, H.J., **1991**. Assessment of microbial cell surface hydrophobicity. *In*: Mozes, N., Handley, P.S., Busscher, H.J., Rouxhet, P.G. (Eds.) *Microbial cell surface analysis. Structural and physicochemical methods*. United States, New York, VCH Publishers, p. 263-287.
- van Duyl, F.C., de Winder, B., Kop, A.J., Wollenzien, U., **1999**. Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. *Marine Ecology Progress Series*. 191, 19-32.
- Vanhaecke, E., Remon, J.P., Moors, M., Raes, F., de Rubber, D., van Peteghem, A., **1990**. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 56, 788-795.
- van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J., **1990**. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*. 54, 75-87.
- van Oss, C.J., **1996**. Forces interfaciales en milieux aqueux. *In*: van Oss, C.J. (Eds.). *France, Paris, Masson*, 402 p.

ABCDEFGHIJKLMNOPQRSTUVWXYZ **VW x YZ**

- Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J., **1988**. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*. 88, 927-941.
- van Oss, C.J., Good, R.J., Chaudhury, M.K., **1986**. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*. 11, 378-390.
- Venkata Rao, E., & Sri Ramana, K., **1991**. Structural studies of a polysaccharide isolated from the green seaweed *Chaetomorpha antennina*. *Carbohydrate Research*. 217, 163-170.
- Verwey, E.J., & Overbeek, J.T.G., **1948**. Theory of the stability of lyophobic colloids. *In*: Verwey, E.J., & Overbeek, J.T.G. (Eds). The Netherlands, Amsterdam, Elsevier, 218p.
- Visser, J., **1976**. Adhesion of colloidal particles. *In*: E. Matijevic (Eds.) *Surface and Colloid Science*, vol 8. United Kingdom, New York, Wiley Interscience, p. 714.
- Whistler, R., & Bemiller, J., **1993**. Industrial gums Polysaccharides and their derivatives (3rd edition). Whistler, R., & Bemiller, J., (Eds). United Kingdom, London, Academic Press, 642p.
- Wigglesworth-Cooksey, B., Berglund, D., Cooksey, K.E., **2001**. Cell-cell and cell-surface interactions in an illuminated biofilm: implications for marine sediment stabilization. *Geochemical Transaction*. 10, published online.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming H.C., **1999**. What are bacterial extracellular polymeric substances? *In*: Wingender, J., Neu, T.R., Stadler, P. (Eds.) *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Germany, Berlin, Springer-Verlag, p. 1-15.
- Witvrouw, M., & De Clercq, E., **1997**. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *General Pharmacology*. 29, 497-511.
- Wu, S., **1982**. Polymer interface and adhesion. *In*: Wu, S. (Eds.). United States, New York, Marcel Dekker, 630 p.
- Wu, W., Giese, R.F., van Oss, C.J., **1999**. Stability versus flocculation of particle suspensions in water. Correlation with the extended DLVO approach for aqueous systems, compared with classical DLVO theory. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 14, 47-55.
- Wustman, B.A., Gretz, M.R., Hoagland, K.D., **1997**. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). I. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms. *Plant Physiology*. 113, 1059-1069.
- Yoon, S.J., Pyun, Y.R., Hwang, J.K., Mourão, P.A.S., **2007**. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity. *Carbohydrate Research*. 342, 2326-2330.
- Young, T., **1805**. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London*. 95, 65-87.
- Zemke-White, W.L., & Ohno, M., **1999**. World seaweed utilization: an end-of-century summary. *Journal of Applied Phycology*. 11, 369-376.
- Zheng, Y., Chen, Y.S., Lu, H.S., **2001**. Screening for antibacterial and antifungal activities in some marine algae from the Fujian Coast of China with three different solvents. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 4, 327-331.
- Zhou, J., Mopper, K., Passow, U., **1998**. The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography*. 43, 1860-1871.



Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion

DOCUMENTS ANNEXES



Publications & Posters

ANNEXES

- **Publication** : Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, *Biochemical Systematics and Ecology*, p. 299-305.
- **Poster** : 25^{ème} Forum des Jeunes Océanographes, 28-29 Octobre 2009, La Rochelle, France, p. 306.
- **Poster** : Biofilms IV, 01-03 Septembre 2010. Winchester, United Kingdom, p. 307.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochemsyseco

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin

Guillaume Pierre^a, Marianne Graber^a, Francis Orvain^b, Christine Dupuy^a, Thierry Maugard^{a,*}

^a UMR 6250 CNRS - ULR LIENSs. Université de La Rochelle, UFR Sciences, Batiment Marie Curie, avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France

^b UMR 100 IFREMER - UCBN LBBM. Université de Caen Basse-Normandie, esplanade de la Paix, 14032 Caen, France

a r t i c l e i n f o

Article history:
Received 22 April 2010
Accepted 26 September 2010

Keywords:
Extracellular compounds
Biochemical characterization
Biofilm
in situ quantification
Benthic ecology

a b s t r a c t

The biochemical characterization of Extracellular Polymeric Substances (EPS) excreted in a European intertidal mudflat (Marennes–Oléron Bay) was performed. Experiments were carried out for the first time in situ, by using an improved extraction recently developed. This innovative procedure, using a cation exchange resin (Dowex), allows separating precisely different fractions of EPS, especially pure bound EPS. Moreover, it avoids the contamination of EPS fractions by residual and intracellular polymers, enabling to properly estimate polymeric contents in each fraction. The results were partly similar to conventional results described in the literature and the amount of colloidal carbohydrates (146 mg/g of dry sediment) extracted by the Dowex method fitted well with different EPS estimation in European mudflats. Colloidal carbohydrates were essentially composed of glucose (> 50%), a carbon source rapidly consumed by the various communities in the sediment. Pure bound carbohydrates were composed of specific carbohydrates (28% rhamnose, 22% xylose). Residual fractions, considered as containing some refractory bound EPS and mostly other internal polymeric substances, presented a more varied composition rich in carbohydrates: galacturonic acid (20%), mannose (19.5%), glucose (19%), arabinose (15%), xylose (8%), galactose (7%).

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The benthic biofilms which developed during the emerged periods in intertidal mudflats are widely studied for various reasons. Considering an ecological perspective, the main reason is to understand the influence of benthic biofilms in intertidal ecosystems, by analyzing their compositions and their changes, depending on environmental parameters. Numerous studies of the last decades have allowed determining their composition and highlighted the presence of microalgae (microphytobenthos), bacteria and fungi, tangled in a complex mixture of polymeric compounds that they produce (Frølund et al., 1996). These Extracellular Polymeric Substances (EPS) are rich in polysaccharides, proteins, proteoglycans, lipids and many other compounds expressed at different levels (Stoodley et al., 2002; Stal, 2003), related to the location or environmental conditions which affect both food web and primary production of this ecosystem (Underwood and Paterson, 2003). EPS are involved in the mobility system of epipellic diatoms (Stal and Défarge, 2005) and can be used as carbon sources by the bacterial community (van Duyl et al., 1999; Hofmann et al., 2009). EPS also affect the microenvironment of biofilms by varying physico-chemical parameters like porosity or mechanical stability of the sediment (Orvain et al., 2003; Perkins et al., 2004; Spears et al., 2008). On the other hand, benthic EPS can present interesting structures and functions, which can be used in

* Corresponding author. Tel.: +33 5 46 45 82 77; fax: +33 5 46 45 82 65.
E-mail address: thierry.maugard@univ-lr.fr (T. Maugard).

52 many biochemical fields. The extraction of sulfated polysaccharides for medicinal applications is one example (Witvrouw and
53 De Clercq, 1997). Many works have already proposed extraction protocols allowing the collection of particular EPS, having
54 specific biochemical properties (Staats et al., 1999; de Brouwer and Stal, 2001; Azerado et al., 2003; Bellinger et al., 2005;
55 Comte et al., 2006). All the data obtained have been each time criticized and authors have agreed that there was no
56 universal extraction method for EPS. Recently, Takahashi et al. (2009) have optimized a protocol for EPS extraction and
57 proposed an innovative method, using a cation exchange resin, to extract cultured diatoms EPS without any contamination by
58 internal compounds. Furthermore, the method allowed the extraction of bound EPS, a fraction poorly studied and heavily
59 contaminated in other previous studies (de Brouwer and Stal, 2004; Chiovitti et al., 2004).

60 The aim of the present investigation was to characterize the biochemical composition of EPS collected from benthic
61 biofilms during emerged periods on a macrotidal bay (Marennes–Oléron Bay, France), using for the first time in situ the
62 Dowex-resin method (Takahashi et al., 2009).

64 2. Methods

66 2.1. Intertidal mudflat samples

67
68 The mud samples used in this study were collected from Marennes–Oléron Bay (Atlantic Coast of France) in February 2008
69 (winter) at low tide (Fig. 1). Two hours after the beginning of the emersion, sediment cores were sampled for three different
70 squares, to take into account spatial heterogeneity. Sediment samples were collected using core diameter of 20 cm, and the
71 top 1 cm was collected three times and pooled to give a main sediment core, for each square. After sampling, sediment was
72 brought back on from the field by using a watercraft for an immediate EPS extraction on fresh sediments on the upper shore.
73 The colloidal, bound and residual fractions were extracted through the Dowex-resin method then biochemical analyses were
74 performed, all in triplicate.

76 2.2. Materials

77
78 Dowex Marathon C, Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit, Azure A, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide:
79 trimethylchlorosilane (BSTFA: TMCS) (99: 1) were obtained from Sigma–Aldrich. Standard carbohydrates (dextran, dextran
80 sulfate, heparin, fucoidan, glucose, galactose, rhamnose, fucose, fructose, xylose, arabinose, mannose, myo-inositol, glu-
81 curonic and galacturonic acid) and a protein standard (Bovine Serum Albumin, BSA) were obtained from Sigma–Aldrich. The
82

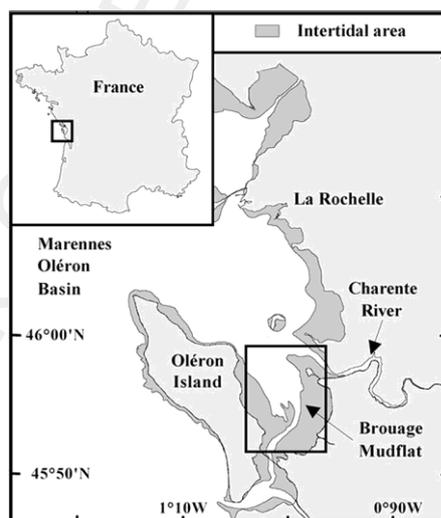


Fig. 1. Station where samples of surficial intertidal sediment were collected, 2 h after the beginning of emerged period.

Please cite this article in press as: Pierre, G., et al., Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, *Biochem. Syst. Ecol.* (2010), doi:10.1016/j.bse.2010.09.014

113 DB-1701 J&W Scientific column (30 m, 0.32 mm, 1 mm) for Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis (GC/MS) was
114 obtained from Agilent.

115

116 2.3. EPS extraction in situ

117

118 The extraction was done immediately after sampling and sediment mixing (Takahashi et al., 2009). 20 mL of fresh mudflat
119 was mixed with 20 mL of Artificial Sea Water (ASW 30 Practical Salinity Units) during 1 h in darkness at 4 °C and then
120 centrifuged at 3500 g and 4 °C for 10 min. The supernatant (a) containing colloidal EPS was collected and stored at 4 °C. 20 mL
121 of ASW and 1 g of activated Dowex (Marathon C, activated in Phosphate Buffer Saline for 1 h in the dark) was added to the
122 cap (b). The samples were mixed gently at 4 °C for 1 h in the dark and then centrifuged at 3500 g and 4 °C for 10 min. A
123 supernatant containing the bound EPS (c) and a cap containing intracellular and residual polymers (d) were obtained. The cap
124 was then frozen. The residual polymers were extracted from the frozen samples, by sonication at 100 W for 3 min on ice after
125 resuspension in 20 mL in ASW.

126 For each fraction (colloidal, bound and residual polymers), absolute ethanol at À20 °C was added to the sample (a) to
127 obtain a final ethanol concentration of 75%(v/v). The solution was gently mixed and stored overnight at À20 °C. The solution
128 was then centrifuged at 3500 g and 4 °C for 15 min to obtain a supernatant (Low Molecular Weight, LMW fraction) and a cap
129 (High Molecular Weight, HMW fraction). Finally, the fractions were dried under air flow and stored at À20 °C.

130

131 2.4. EPS composition

132

133 Total sugar content was determined using the phenol-sulfuric acid assay, developed by Dubois, using glucose as a standard
134 (Dubois et al., 1956). Protein content was determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay, using bovine serum albumin
135 (BSA) as a standard (Smith et al., 1985). Uronic acid content was determined using the meta-hydroxydiphenyl method
136 (MHDP), using galacturonic and glucuronic acids as standards (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973; Filisetti-Cozzi and
137 Carpita, 1991). The sulfate content was measured by the Azure A (Jaques et al., 1968) and the Ba/Cl₂ gelation method
138 (Craigie et al., 1984), using Dextran sulfate as a standard.

139

140 2.5. Sugar characterization

141

142 Prior to carbohydrate characterization by GC/MS, EPS fractions were solubilized in 5 mL of ultra-pure water, dialyzed (6–
143 8 kDa) and freeze-dried (Bellinger et al., 2005). EPS were then dissolved in 2M HCl at 50 mg/mL and heated at 90 °C for 4 h.
144 The preparation (which contained mostly carbohydrates monomers) was then freeze-dried and stored at À20 °C. Analysis of
145 the carbohydrate fractions was carried out by GC/MS using a Varian CP-3800 GC/Varian Saturn 2000 (Fig. 2). Operating
146 conditions have been determined and optimized in the laboratory (data not shown). 400 mL of pyridine and 400 mL of BSTFA:
147 TMCS (99:1) was added to 2 mg of purified polysaccharides. The solution was mixed for 2 h at room temperature, then
148 injected into a DB-1701 J&W Scientific column (30 m, 0.32 mm, 1 mm) at a flow of 1 mL/min. The helium pressure was 8.8 psi.
149 The temperature of the injector was set at 250 °C. The rise in temperature in the oven was programmed for a first step at
150 150 °C for 0 min, then an increment of 10 °C/min up to 200 °C with a final step at 200 °C for 35 min. The ionization was
151 performed by Electronic Impact (EI, 70 eV), the trap temperature was set at 150 °C and the target ion was fixed at 40–650 m/z.

152

153 3. Results and discussion

154

155 3.1. Type and composition of EPS

156

157 Despite the fact that common practice is to freeze sediments at À80 °C to eliminate the consumption of EPS by bacteria,
158 Takahashi's extraction method focus on the use of fresh sediments to avoid cells lysis (Takahashi et al., 2009), which supports
159 other studies concerning the contamination of EPS fractions by internal storage compounds, as glucans, proteins and
160 chrysolaminaran (de Brouwer and Stal, 2001; Hanlon et al., 2006). The addition of Dowex resin to a classical procedure clearly
161 defines pools of carbohydrates, depending on their properties and localization in the matrix complex (Bellinger et al., 2005;
162 Abdullahi et al., 2006).

163 Overall, 1 g of dry sediment is composed of 1618 mg of carbohydrates and 383 mg of proteins (Tables 1 and 2). Although this
164 concentration may seem low, EPS are extracted from crude samples. Different authors have shown that natural mudflats
165 samples may contain large quantities of mineral impurities and salt (de Brouwer and Stal, 2001; Underwood and Paterson,
166 2003). The amounts of carbohydrates were slightly higher than those measured at the same station in 1998 (Stal and
167 Défarge, 2005). These authors had worked from the first 5 mm of sediment, which represent more accurately the micro-
168 phytobenthic biofilm. Our approach (first 10 mm) could overestimate diatom EPS production due to the contamination from
169 other sediment EPS sources (Perkins et al., 2003).

170 Colloidal fractions were rich in carbohydrates (Æ50/50%LMW/HMW) (Tables 1 and 2). LMW colloidal fractions could be
171 compared to the low molecular weight exudates and HMW colloidal fractions EPS extracted by various authors (Abdullahi
172 et al., 2006; Hanlon et al., 2006). The total amount of colloidal carbohydrate (neutral carbohydrates and uronic acids)
173 given in Table 1 (146 mg.g⁻¹ sediment) fitted with common results described in literature: 50–5000 mg.g⁻¹ sediment.

Please cite this article in press as: Pierre, G., et al., Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, Biochem. Syst. Ecol. (2010), doi:10.1016/j.bse.2010.09.014

174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234

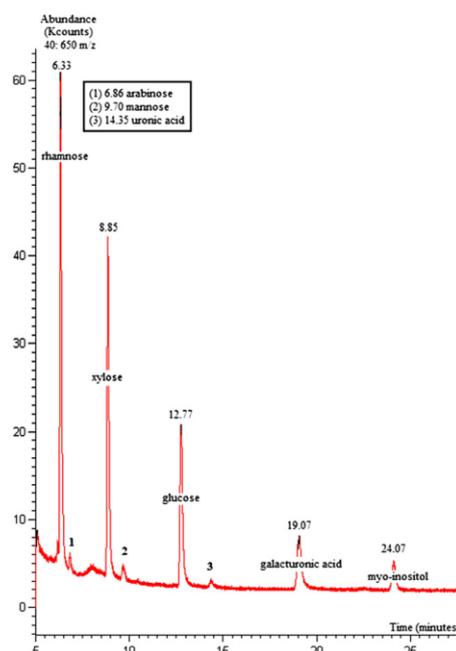


Fig. 2. GC-MS chromatogram of carbohydrates detected in an HMW bound fraction. Ionization: Electronic Impact (EI). Target ion: 40–650 m/z.

Similarly, the bound fractions were composed of carbohydrates (87% LMW). The total amount of bound carbohydrates was closed to the concentrations of total colloidal carbohydrates ($\approx 13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$). This result would indicate that, in general, the colloidal and bound EPS are produced in close quantities in this benthic ecosystem. However, this amount of bound carbohydrates is lower than other amounts measured for European mudflats and suggests that our fractions were not contaminated by residual and internal carbohydrates. Colloidal and bound fractions did not contain proteins, in contrast to many previous works (de Brouwer and Stal, 2001; Underwood and Paterson, 2003; Hanlon et al., 2006; Hofmann et al., 2009). This lack seems to confirm that our EPS fractions were not contaminated by residual and internal storage polymers (Staats et al., 2000; Orvain et al., 2003).

Finally, the residual fractions were widely extracted compared to the EPS fractions (Table 2) and presented a complex composition especially because of the presence of proteins (22%) and sulfated components (15% of the total amount of carbohydrates) (Table 1). Our residual polymers found could be compared to the complex cell wall-associated and the intracellular polymers of diatoms, widely described in the literature (glucan, chrysolaminaran). Otherwise, these residual fractions must also contain some refractory EPS that were not extracted with the Dowex-resin.

Table 1
Composition ($\mu\text{g/g}$ of dry sediment) of the different fractions extracted by the Dowex method from the Marennes–Oléron mudflat.

Fraction	Neutral carbohydrate content	Uronic acid content	Sulfate content	Protein content
LMW colloidal	59 \pm 8	23 \pm 9	0	0
HMW colloidal	57 \pm 16	7 \pm 2	0	0
LMW bound	76 \pm 8	22 \pm 10	0	0
HMW bound	11 \pm 2	4 \pm 2	0	0
LMW residual	413 \pm 79	112 \pm 38	0	180 \pm 72
HMW residual	530 \pm 155	304 \pm 172	204 \pm 66	203 \pm 55

\pm deviations were calculated from the heterogeneity of the different sampling squares and not from the true replicates of the biochemical analysis (<5%).

Please cite this article in press as: Pierre, G., et al., Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, *Biochem. Syst. Ecol.* (2010), doi:10.1016/j.bse.2010.09.014

235 Table 2
236 Distribution of carbohydrates in the three fractions of EPS.

237	% (w/w)	Fraction Ratio	Low Molecular Weight	High Molecular Weight
238	Colloidal carbohydrates	9	56	44
239	Bound carbohydrates	7	87	13
240	Residual carbohydrates	84	39	61
241	Total carbohydrates	100 ^a	43	57

242 ^a (1618 mg/g of dry sediment).

243

244 3.2. Model of Underwood & Smith

245

246 The colloidal EPS quantities measured in the Marennes–Oléron mudflat were compared to the predicted quantities given
247 by the model of Underwood & Smith, which was used to determine the amount of colloidal carbohydrates produced in
248 European mudflats (Underwood and Smith, 1998).

249

$$250 \log(\text{coll. carbohydrates content} + 1) = 1.40 + 1.02 \times \log(\text{Chl a content} + 1)$$

$$251 r^2 = 64.6\%$$

252

253 The model was applied to the concentrations of Chlorophyll a (in average, 21.5 mg Chl a/g dw sediment) measured in situ
254 during the sampling campaign. Considering the relationship and the r^2 , the amount of colloidal carbohydrates extracted by
255 the Dowex-resin was in accordance with the model, suggesting that the Dowex method allowed extracting in full the colloidal
256 EPS.

257

258

259 3.3. Sugar characterization

260

261 GC–MS results indicated that the carbohydrate portions were formed of nine different types of monomer units (Fig. 3),
262 including seven neutral sugars and two uronic acids. The colloidal EPS fractions had a high glucose content (> 50%), the bound
263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

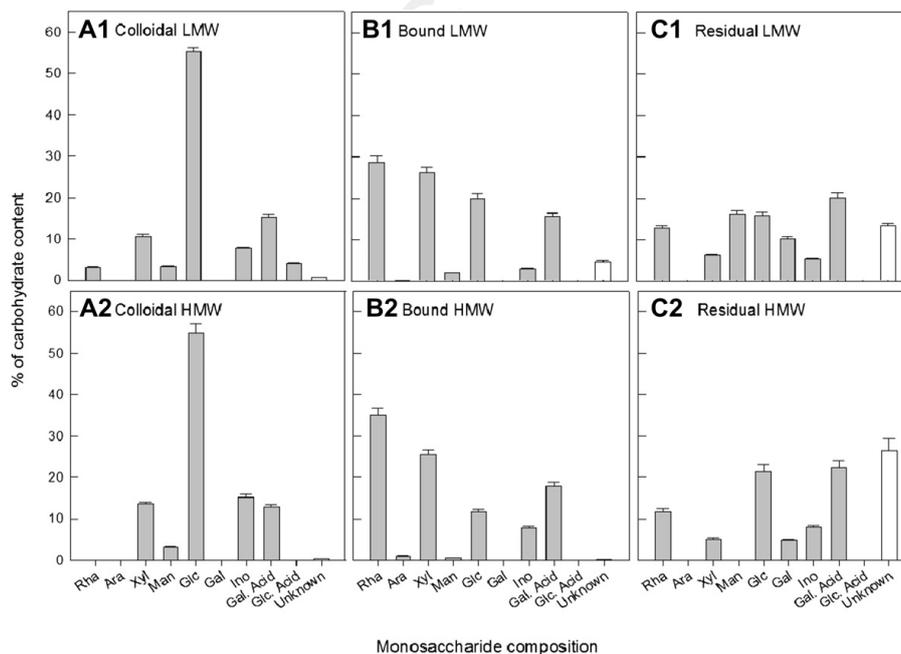


Fig. 3. Monosaccharide composition of the different EPS fractions collected on the Marennes–Oléron mudflat (% of the carbohydrate content) after 2 h of emersion. Ionization: Electronic Impact (EI). Target ion: 40–650 m/z. The variability within true sample replicate was less than 5% (White): Unknown, undetermined on GC/MS.

Please cite this article in press as: Pierre, G., et al., Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, *Biochem. Syst. Ecol.* (2010), doi:10.1016/j.bse.2010.09.014

296 EPS fractions were mainly composed of rhamnose, xylose, glucose, galacturonic acid and the residual polymeric fractions
297 had a more varied composition in monosaccharides, including a greater unknown.

298 The monosaccharide distribution between LMW and HMW of the colloidal fractions was quite similar, although there were
299 a few amount of rhamnose in LMW fractions (Fig. 3, A1-A2). Colloidal EPS fractions were mainly composed of glucose, which
300 could explain why this fraction is easily consumable by heterotrophic bacteria in the extracellular medium (van Duyl et al.,
301 1999; Bellinger et al., 2005; Hofmann et al., 2009). Our results were close to previous works, which showed the predominance
302 of glucose (50%), galactose, xylose (15%) or galacturonic acid (15%) in colloidal fractions extracted by the same way (Abdullahi
303 et al., 2006; Hanlon et al., 2006). In contrast to previous works where bound fractions were extracted, glucose is not the main
304 saccharide (less than 20%) of bound EPS fractions (Fig. 3, B1-B2). The content of specific sugars in these fractions can be better
305 estimated and bound EPS were mainly composed of rhamnose (28%), xylose (22%) and galacturonic acid (18%). The accurate
306 composition of bound EPS, enriched in deoxy and specific sugars, is very important for understanding the functional role of
307 bound EPS. Deoxy sugars can promote biostabilisation of sediments (Zhou et al., 1998; Girollo et al., 2003) through their
308 surface active properties. Deoxy sugars can also influence the hydrophobic character of EPS, playing a role on the adhesion of
309 EPS to sediment or on the regulation of desiccation and salinity (Spears et al., 2008). However, it was surprising that fucose
310 has not been highlighted although the GC–MS method allowed its detection. It is therefore possible that the lack of fucose was
311 linked to the environmental conditions or the physiological state and the quantity of benthic diatoms forming the benthic
312 biofilm during winter (Sal and Défarge, 2005; Bellinger et al., 2009). The presence of inositol (-myo) is significant since no
313 author has highlighted it. Inositol is involved in the structural basis for a number of secondary messengers in eukaryotic cells
314 and is a major growth factor for many organisms, especially for heterotrophic bacteria. Residual fractions were mainly
315 composed of polysaccharides rich in glucose (derived from β -1,3-linked glucan or chrysolaminaran) and mannose, rhamnose,
316 xylose (Fig. 3, C1-C2). It is important to note that a portion of these sugars must come from refractory bound EPS.

317 On the whole, our results confirmed the relevance and the effectiveness of Takahashi's method for in situ experiments.
318 Bound fractions were biochemically different from the two other fractions, thanks to the presence of large amounts of deoxy
319 sugars and uronic acids. In this way, it can be supposed that the levels of rhamnose, mannose or galacturonic acid played a role
320 during the development of the microphytobenthic biofilm by increasing binding forces or enhancing the incorporation of
321 water. The surprising lack of fucose has been correlated to the sampling period. The presence of inositol was detected for
322 a first time in situ. This sugar is commonly used for GC/MS analysis (internal standard) and this could explain why it was not
323 identified as a component of EPS. Significant amounts of this growing factor for bacteria were measured in the colloidal
324 fraction, a fraction known as being a direct nutrient source for the heterotrophic bacteria. Finally, it would be interesting to
325 extract and characterize in situ the same EPS fractions depending on environmental conditions.

326

327

328 Acknowledgements

329

330 This study was supported by the Conseil Général of Charentes-Maritime and the Centre National de la Recherche Sci-
331 entifique. The field sampling was supported by the French ANR (National Research Agency) through the VASREMI project
332 "Trophic significance of microbial biofilms in tidal flats" (contract ANR-06-BLAN-0393-01).

333

334

335 References

336

- 337 Abdullahi, A.S., Underwood, G.J.C., Gretz, M.R., 2006. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on poly-
338 saccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.* 42, 363–378.
- 339 Azerado, J., Henriques, M., Silankorva, S., Oliveira, R., 2003. Extraction of exopolymers from biofilm: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci.*
340 *Technol.* 47, 175–179.
- 341 Bellinger, B.J., Abdullahi, A.S., Gretz, M.R., Underwood, G.J.C., 2005. Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine
342 mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 169–180.
- 343 Bellinger, B.J., Underwood, G.J.C., Ziegler, S.E., Gretz, M.R., 2009. Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms
344 determined through isotopic enrichment. *Aquat. Microb. Ecol.* 55, 169–187.
- 345 Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489.
- 346 Chiovitti, A., Molino, P., Crawford, S.A., Ten, R., Spurck, T., Wetherbee, R., 2004. The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived
347 from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *Eur. J. Phycol.* 39, 117–128.
- 348 Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS
349 complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 237–245.
- 350 Craigie, J.S., Wen, Z.C., van der Meer, J.P., 1984. Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria*
351 spp. *Bot. Mar.* 27, 55–61.
- 352 de Brouwer, J.F.C., Stal, L.J., 2001. Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments
353 of an intertidal mudflat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 218, 33–44.
- 354 de Brouwer, J.F.C., Stal, L.J., 2004. Does warm-water extraction of benthic diatoms yield extracellular polymeric substances or does it extract intracellular
355 chrysolaminaran? *Eur. J. Phycol.* 39, 129–131.
- 356 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28,
357 350–356.
- 358 Filisetti-Cozzi, T.M., Carpita, N.C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197, 157–162.
- 359 Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.*
360 30, 1749–1758.
- 361 Girollo, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by
362 a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 39, 1109–1115.

Please cite this article in press as: Pierre, G., et al., Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, *Biochem. Syst. Ecol.* (2010), doi:10.1016/j.bse.2010.09.014

296 EPS fractions were mainly composed of rhamnose, xylose, glucose, galacturonic acid and the residual polymeric fractions
297 had a more varied composition in monosaccharides, including a greater unknown.

298 The monosaccharide distribution between LMW and HMW of the colloidal fractions was quite similar, although there were
299 a few amount of rhamnose in LMW fractions (Fig. 3, A1-A2). Colloidal EPS fractions were mainly composed of glucose, which
300 could explain why this fraction is easily consumable by heterotrophic bacteria in the extracellular medium (van Duyl et al.,
301 1999; Bellinger et al., 2005; Hofmann et al., 2009). Our results were close to previous works, which showed the predominance
302 of glucose (50%), galactose, xylose (15%) or galacturonic acid (15%) in colloidal fractions extracted by the same way (Abdullahi
303 et al., 2006; Hanlon et al., 2006). In contrast to previous works where bound fractions were extracted, glucose is not the main
304 saccharide (less than 20%) of bound EPS fractions (Fig. 3, B1-B2). The content of specific sugars in these fractions can be better
305 estimated and bound EPS were mainly composed of rhamnose (28%), xylose (22%) and galacturonic acid (18%). The accurate
306 composition of bound EPS, enriched in deoxy and specific sugars, is very important for understanding the functional role of
307 bound EPS. Deoxy sugars can promote biostabilisation of sediments (Zhou et al., 1998; Giroldo et al., 2003) through their
308 surface active properties. Deoxy sugars can also influence the hydrophobic character of EPS, playing a role on the adhesion of
309 EPS to sediment or on the regulation of desiccation and salinity (Spears et al., 2008). However, it was surprising that fucose
310 has not been highlighted although the GC-MS method allowed its detection. It is therefore possible that the lack of fucose was
311 linked to the environmental conditions or the physiological state and the quantity of benthic diatoms forming the benthic
312 biofilm during winter (Sal and Défarge, 2005; Bellinger et al., 2009). The presence of inositol (-myo) is significant since no
313 author has highlighted it. Inositol is involved in the structural basis for a number of secondary messengers in eukaryotic cells
314 and is a major growth factor for many organisms, especially for heterotrophic bacteria. Residual fractions were mainly
315 composed of polysaccharides rich in glucose (derived from β -1,3-linked glucan or chrysolaminaran) and mannose, rhamnose,
316 xylose (Fig. 3, C1-C2). It is important to note that a portion of these sugars must come from refractory bound EPS.

317 On the whole, our results confirmed the relevance and the effectiveness of Takahashi's method for in situ experiments.
318 Bound fractions were biochemically different from the two other fractions, thanks to the presence of large amounts of deoxy
319 sugars and uronic acids. In this way, it can be supposed that the levels of rhamnose, mannose or galacturonic acid played a role
320 during the development of the microphytobenthic biofilm by increasing binding forces or enhancing the incorporation of
321 water. The surprising lack of fucose has been correlated to the sampling period. The presence of inositol was detected for
322 a first time in situ. This sugar is commonly used for GC/MS analysis (internal standard) and this could explain why it was not
323 identified as a component of EPS. Significant amounts of this growing factor for bacteria were measured in the colloidal
324 fraction, a fraction known as being a direct nutrient source for the heterotrophic bacteria. Finally, it would be interesting to
325 extract and characterize in situ the same EPS fractions depending on environmental conditions.

326

327

328

Acknowledgements

329

330 This study was supported by the Conseil Général of Charentes-Maritime and the Centre National de la Recherche Sci-
331 entifique. The field sampling was supported by the French ANR (National Research Agency) through the VASREMI project
332 "Trophic significance of microbial biofilms in tidal flats" (contract ANR-06-BLAN-0393-01).

333

334

335

References

336

- 337 Abdullahi, A.S., Underwood, G.J.C., Gretz, M.R., 2006. Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on poly-
338 saccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Phycol.* 42, 363–378.
- 339 Azerado, J., Henriques, M., Silankorva, S., Oliveira, R., 2003. Extraction of exopolymers from biofilm: the protective effect of glutaraldehyde. *Water Sci.*
340 *Technol.* 47, 175–179.
- 341 Bellinger, B.J., Abdullahi, A.S., Gretz, M.R., Underwood, G.J.C., 2005. Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine
342 mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat. Microb. Ecol.* 38, 169–180.
- 343 Bellinger, B.J., Underwood, G.J.C., Ziegler, S.E., Gretz, M.R., 2009. Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms
344 determined through isotopic enrichment. *Aquat. Microb. Ecol.* 55, 169–187.
- 345 Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489.
- 346 Chiovitti, A., Molino, P., Crawford, S.A., Ten, R., Spurck, T., Wetherbee, R., 2004. The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived
347 from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *Eur. J. Phycol.* 39, 117–128.
- 348 Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS
349 complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 237–245.
- 350 Craigie, J.S., Wen, Z.C., van der Meer, J.P., 1984. Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria* spp. *Bot. Mar.* 27, 55–61.
- 351 de Brouwer, J.F.C., Sal, L.J., 2001. Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments
352 of an intertidal mudflat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 218, 33–44.
- 353 de Brouwer, J.F.C., Sal, L.J., 2004. Does warm-water extraction of benthic diatoms yield extracellular polymeric substances or does it extract intracellular
354 chrysolaminaran? *Eur. J. Phycol.* 39, 129–131.
- 355 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28,
356 350–356.
- 357 Filisetti-Cozzi, T.M., Carpita, N.C., 1991. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* 197, 157–162.
- 358 Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.*
359 30, 1749–1758.
- 360 Giroldo, D., Vieira, A.A.H., Paulsen, B.S., 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by
361 a tropical freshwater *Thalassiosira* sp. (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 39, 1109–1115.

Please cite this article in press as: Pierre, G., et al., Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin, *Biochem. Syst. Ecol.* (2010), doi:10.1016/j.bse.2010.09.014



Caractérisation biochimique de Substances Polymériques Extracellulaires extraites des vasières de Marennes-Oléron

G. PIERRE*, M. GRABER*, C. DUPUY*, F. ORVAIN*, T. MAUGARD*

(a) Unité Mixte de Recherche 6250 CNRS - ULR Littoral, Environnement et Sociétés, Equipe Biotechnologies Environnementales.
(b) Unité Mixte de Recherche 6250 CNRS - ULR Littoral, Environnement et Sociétés, Equipe Dynamique Fonctionnelle des Ecosystèmes côtiers Anthropisés.
(c) Unité Mixte de Recherche 100 IFREMER - UCBN Laboratoire de Biologie et de Biotechnologies Marines
* Tel : (33) 5 46 45 87 21 Fax : (33) 5 46 45 82 65 E-mail : gpcmr02@univ-lr.fr



A1 Introduction

Les vasières intertidales forment la transition entre le bassin versant et le domaine océanique. L'élaboration de modèles conceptuels de ces vasières a notamment permis de mettre en évidence le rôle des algues benthiques et de bactéries présentes à la surface de la vase, en formant des micro-consortia particuliers : les biofilms benthiques [1, 2]. La complexité des processus physiques et biologiques mis en jeu au sein de ces biofilms est d'ailleurs à l'origine de la production primaire massive des vasières [3]. Les biofilms benthiques peuvent être considérés comme des communautés complexes,

composées en particulier de microalgues, de bactéries [4] et de matières cohésives plus communément appelées Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) [5, 6]. L'excrétion de ces hétéropolymères dans le milieu est un point d'ancrage important dans les processus de formation et de vie des biofilms. En outre, ces SPE jouent de nombreux rôles pouvant aller de la simple source trophique en carbone pour les organismes hétérotrophes des vasières jusqu'à les impliquer dans la dynamique cohésive et sédimentaire des vasières (mobilités, échanges ioniques, adhésion) [7].

A2 Mots-Clés (1) biofilm benthique (2) Substances Polymériques Extracellulaires (3) exopolymères (4) écologie benthique (5) caractérisation biochimique (6) carbohydrates

B1 Objectifs

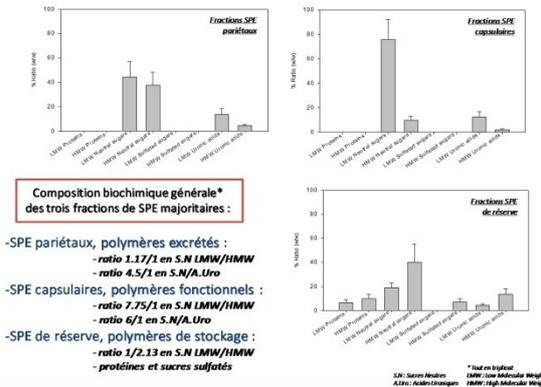
L'étude a été réalisée sur la vasière intertidale de Brouage (17, France).

Les SPE ont été extraites via l'utilisation d'un nouveau protocole d'extraction (Dowex® : résine échangeuse d'ions) permettant de récupérer plusieurs fractions^(a), notamment en fonction de leurs propriétés, de leurs tailles (kDa) et de leurs localisations dans les biofilms benthiques étudiés.

L'élaboration et la maîtrise de différentes méthodologies⁽¹⁾ et protocoles biochimiques⁽²⁾ (CPG/SM⁽¹⁾, CLHP⁽¹⁾), dosages colorimétriques⁽³⁾ ont permis de caractériser les différentes fractions de SPE de cette étude^(C1, C2, C3).



C1 Résultats : Composition biochimique

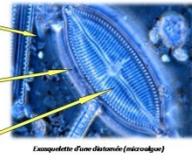


B2 Fractions de SPE extraites du sédiment

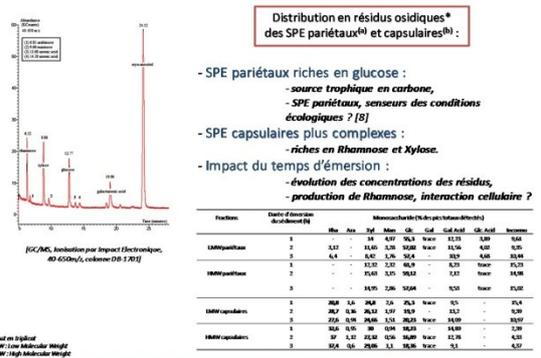
Fractions colloïdales riches en SPE pariétaux (SEP libres situées dans la matrice du biofilm)

Fractions liées riches en SPE capsulaires (SEP étroitement liées aux microalgues et bactéries)

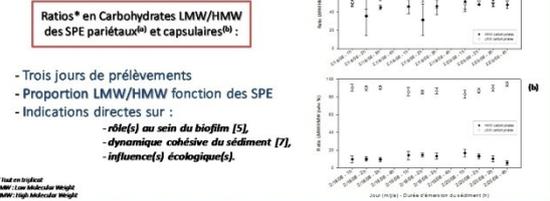
Fractions internes riches en SPE de réserve (SEP de haut poids moléculaire - forme de stockage)



C2 Résultats : Distribution en monosaccharides



C3 Résultats : SPE LMW/HMW



D Conclusion

Ces travaux ont permis de mettre en évidence :

- la pertinence de cette méthodologie (qualité des résultats chromatographiques),
- la complexité et la variété des SPE,
- l'abondance colloïdale du glucose (source carbonée pour les bactéries),
- la présence de xylose et rhamnose dans les fractions capsulaires, (unité constitutive de mucilages polymériques, interactions cellulaires).

E Perspectives

L'analyse actuelle des échantillons obtenus au cours d'une deuxième campagne permettra d'éclairer l'impact de paramètres environnementaux (hiver/été) [6] sur la complexité des SPE produites au sein des vasières intertidales de Marennes-Oléron. Les concentrations de SPE seront également analysées en fonction des concentrations en chlorophylle *a* du milieu ou des abondances bactériennes afin de mieux comprendre ces fluctuations biochimiques.

[1] HIERLORY D. (2005). Etude du biofilm microalgues des vasières intertidales : dynamique spatio-temporelle à micro-échelle et performances photosynthétiques. Thèse d'océanologie biogéochimie et d'environnement marin. La Rochelle : Université de La Rochelle, 204p.
[2] PRILL I. S., ANI A. C. (2002). Biofilm diatom community structure: influence of temporal substrate variability. *Bioprocessing*, 21, 189-206.
[3] GIURANI I. M., BANCHARD G. F., GIROS P. (2000a). Quantification of the microphytobenthic primary production in European intertidal mudflats: a modeling approach. *Cont. Shelf Res.* 20, 1771-1788.
[4] FUHRMANN J. A. (2009). Microbial community structure and its functional implications. *Nature*, 459, 193-199.
[5] DE BROUWERE J. F. C., STAL L. J. (2001). Short term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 218, 33-44.

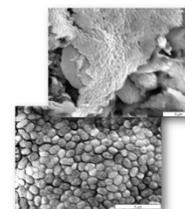
[6] UNDERWOOD J. C., INTERSON D. M. (2003). The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. In : *Advances in Botanical Research*, J. A. Callow(ed.), London : Elsevier, 2003, 49, 184-231.
[7] INTERSON D. M., BLACK E. S. (1999). Water flow, sediment dynamics and benthic biology. *Adv. Ecol. Res.* 29, 155-193.
[8] FALCIATORE A., DALCALA M. R., CRODT P., BOWLER C. (2000). Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science*, 288, 2363-2366.



Inverse Gas Chromatography: a novel method to determine the surface properties of microbial cells

G. PIERRE^a, S. JAZZAR^a, R. VILLEGIER^a, T. MAUGARD^a, M.N. BELON-FONTAINE^b, M. GRABER^{b*}

(a) Unité Mixte de Recherche 6250 CNRS - ULR Littoral, Environnement et Sociétés, Equipe Biotechnologie Environnementale, La Rochelle, France.
 (b) Unité Mixte de Recherche 0763 - Unité de Bioadhésion et d'Hygiène des Matériaux, INRA Agro-Paris Tech, Massy, France.
 * Tel : (33) 5 46 45 86 30 Fax : (33) 5 46 45 82 65 E-mail : mgraber@univ-lr.fr



A1 Introduction

Biofilm formation involves several steps [1]: the transport and conditioning phase, the initial adhesion of microorganisms, the attachment stage and the final step of colonization. In order to better control biofilm formation and biofouling, the understanding of the initial steps of microbial adhesion, which mainly consists in non-specific physico-chemical interactions, is of crucial importance [2]. Therefore, it is necessary to offer new techniques for measuring surface properties of microorganisms, which determine the type and strength of these interactions. To characterize microbial cell surfaces, we have developed a simple and accurate method by using Inverse Gas Chromatography (IGC). IGC is a vapor adsorption method based on the analysis of the stationary phase whose surface characteristics are studied⁽³⁾ [3]. The method allows calculating parameters such as specific and dispersive components⁽³⁾ of the surface energy of microbial cells.

A2 Keywords

- (1) Bacteria
- (2) Biofilm
- (3) Physico-chemical surface properties
- (4) Inverse Gas Chromatography
- (5) Angle contact measurements
- (6) Lewis acid-base interactions
- (7) London interactions

B1 Goals

We have analyzed the surface properties of two bacterial strains : *Hafnia alvei* (A) and *Lactococcus lactis* (B).

After culture under well defined conditions, washing and freeze-drying, bacteria were used to make the stationary phase which was analyzed by IGC.

The effectiveness, accuracy and reproducibility of the IGC method were evaluated by comparing IGC results with those obtained by classical measurements : contact angle measurements [4], infrared spectroscopy and also by the MATS (Microbial Adhesion To Solvents) method [5].

C2 IGC method and classical measurements

Model strains	Contact angles			
	Diiodomethane	ethylene glycol	formamide	Water
<i>Lactococcus lactis</i>	46.6 ± 0.8	36 ± 1.9	36.3 ± 4.2	31.4 ± 1.4
<i>Hafnia alvei</i>	52.6 ± 2.7	49.7 ± 0.9	48 ± 2.9	48.3 ± 3.1

Model strains	Surface energy (mJ/m ²)				
	γ ^s (mJ/m ²)	γ ^d (mJ/m ²)	γ ^p (mJ/m ²)	γ ^{ap} (mJ/m ²)	γ ^{bp} (mJ/m ²)
<i>Lactococcus lactis</i>	34.5 ± 0.4	81.7 ± 5.4	0.8 ± 0.3	23.8 ± 4.3	47.8 ± 4.3
<i>Hafnia alvei</i>	32.8 ± 1.5	98.2 ± 5.6	0.6 ± 0.2	11.8 ± 4.1	44.6 ± 4.5

Contact angle measurements [4]

- Hydrophilic character⁽¹⁾:**
Lactococcus lactis > *Hafnia alvei*⁽²⁾
Lactococcus lactis = *Hafnia alvei*⁽²⁾
- Basic character⁽³⁾:**
Lactococcus lactis > *Hafnia alvei*
- Acidic character⁽⁴⁾:**
Lactococcus lactis = *Hafnia alvei*
- (1) Low values of θ₁
 (2) γ^{sp} > γ^{ap} / γ^{sp} > γ^{bp} (Polar & Disper forces insignificant)
 (3) High values of γ^p
 (4) Very weak values of γ^p

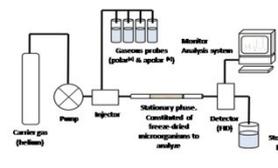
IGC method

- γ^s parameters⁽¹⁾:**
Lactococcus lactis = *Hafnia alvei*
- Basic character⁽²⁾:**
Lactococcus lactis < *Hafnia alvei*
- Acidic character⁽³⁾:**
Lactococcus lactis = *Hafnia alvei*⁽⁴⁾
- (1) High values of γ^s, reflecting non-polar surfaces
 (2) High affinity for acidic probes (polar probes)
 (3) High affinity for basic probes (L-L character)
 (4) Low affinity for basic probes (L-L character)

MATS method [5]

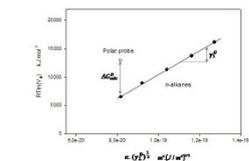
- Hydrophilic character⁽¹⁾:**
Lactococcus lactis (A) > *Hafnia alvei* (B)
- Lewis acid/base character⁽²⁾:**
Hafnia alvei more dependent to solvents
- (1) Low affinity for n-alkanes
 (2) Affinity for the couple chloroform (acidic solvent) / ethyl acetate

C1 Inverse Gas Chromatography system



(a) Allow calculating the specific component of the surface energy from ΔG_{ads}^{SP} of microbial cells [3, 6, 7].
 → Lewis acid/base character of microbial cells.

(b) Allow calculating the dispersive component of the surface energy γ_s^d of microbial cells [3, 6, 7].
 → ability of cell surfaces to establish London interactions.



D Conclusions and outlooks

On the whole, the results showed that it was possible to use IGC to evaluate the surface properties of bacterial cells, the present technique offering some advantages and alternative results compared to the existing methods. Improvements of the IGC method are prospecting by using a new module. This additional module will allow working on bacterial layers (close to the methodology of contact angle measurements) instead of studying vertical beds constituted of bacterial particles.

[1] M.N. Belon-Fontaine, F. Dubois-Brissonnet, J.M. Henry, T. Meylheuc, M. Naitali, M. Renault, A.M. Riquet and R. Blandet, *Salles Propres*, 56 (2008) 32.
 [2] S. Rayouab, A. Othmane, E. Beltaieb, A. Bahrouf, H. Ben Ouada and I. Panseronet, *Mat. Sci. Eng.*, 26 (2006) 300.
 [3] J.R. Conder and C.L. Young, in: *J. Wiley & Sons (Eds.), Physicochemical Measurement by Gas Chromatography*, Wiley Interscience, Chichester, New York, 1979, p. 637.
 [4] C.J. van Oss, M.R. Chaudhury and R.J. Good, *Chem. Rev.*, 88 (1988) 927.
 [5] M.N. Belon-Fontaine, J. Baudrand, C.J. van Oss, *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, 7 (1998) 53.
 [6] S. Combe, R. Cabrol, J.A. Dods and H. Babin, *Food. Technol.*, 157 (2005) 39.
 [7] J.B. Lloyd, *Colloid Surfaces A: Physicochem. Eng.*, 93 (1994) 36.

Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion.

Résumé :

Le principal objectif de cette thèse était de mieux comprendre l'importance des Substances Polymériques Extracellulaires (SPE) dans la structuration et la formation des biofilms benthiques ; tout en s'inscrivant dans une étude plus globale des mécanismes écologiques impliqués dans le fonctionnement des vasières intertidales. La mise au point des dosages biochimiques a été effectuée sur le mucilage de l'algue *Chaetomorpha aerea* et a permis en parallèle de purifier un polysaccharide sulfaté riche en galactose, présentant une activité bactéricide sélective contre la souche *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Les études biochimiques et écologiques menées sur les SPE extraits de la vasière charentaise ont ensuite permis de quantifier leur dynamique de production et leur composition, en fonction des conditions environnementales. La présence de désoxy-sucre et d'acides uroniques au sein des SPE capsulaires a laissé supposer que ces fractions jouaient un rôle important dans la formation et le devenir du biofilm microphytobenthique. La dernière partie des travaux a permis de caractériser les propriétés acide/base de Lewis et hydrophile/hydrophobe de la surface de la micro-algue *Navicula jeffreyi*, impliquée dans la formation de biofilms benthiques, par des méthodes classiques d'analyse. L'utilisation d'une nouvelle méthode, la Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI), a permis d'obtenir des résultats intéressants et relativement similaires, confirmant le caractère prometteur de la CGI pour l'étude des propriétés de surface des micro-organismes.

Mots-clés : Adhésion primaire, Biofilm, Chromatographie Gazeuse Inverse (CGI), Ecologie benthique, Exopolymères, Mycophytobenthos, Micro-organismes, Propriétés physico-chimiques de surface, Substances Polymériques Extracellulaires (SPE)

Biochemical characterization of algal exopolymers from Marennes-Oléron and study of the physico-chemical surface properties of microorganisms involved in their adhesion.

Summary:

The main goal of this thesis was to better understand the importance of Extracellular Polymeric Substances (EPS) in the structuring and formation of benthic biofilms; while considering a global conception of the ecological mechanisms involved in the functioning of intertidal mudflats. The development of the biochemical assays was done on the mucilage of the macroalgae *Chaetomorpha aerea* and allowed purifying a polysaccharide rich in galactose, showing a selective bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Then, the biochemical and ecological studies concerning the EPS extracted from the local mudflat allowed studying their dynamic of production and composition in relation to environmental conditions. The presence of deoxy sugars and uronic acids in the bound EPS highlighted their important roles during the formation and the life of microphytobenthic biofilms. The last part of the work was used to characterize the acid/base of Lewis and hydrophilic/hydrophobic surface properties of the microalgae *Navicula jeffreyi*, involved in the formation of benthic biofilms, by using classical analysis methods. The use of a new method, named Inverse Gas Chromatography (IGC), allowed getting interesting and relatively similar results, confirming the potential of the method to study the surface properties of microorganisms.

Keywords: Primary adhesion, Biofilm, Inverse Gas Chromatography (IGC), Benthic ecology, Exopolymers, Mycophytobenthos, Microorganisms, Surface physico-chemical properties, Extracellular Polymeric Substances (EPS)

Littoral ENvironnement Sociétés (LIENSs) Equipe Biotechnologie Environnementale (BIEN)
UMR 6250, Université de La Rochelle, 2, Rue Olympe de Gouges, 17042 LA ROCHELLE

