



HAL
open science

Étude de la survie de contaminants bactériens modèles d'origine industrielle, isolés d'environnements oligotrophes, et élaboration de milieux synthétiques permettant leur croissance

Antoine Gillmann

► **To cite this version:**

Antoine Gillmann. Étude de la survie de contaminants bactériens modèles d'origine industrielle, isolés d'environnements oligotrophes, et élaboration de milieux synthétiques permettant leur croissance. Microbiologie et Parasitologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ004 . tel-01718377

HAL Id: tel-01718377

<https://theses.hal.science/tel-01718377>

Submitted on 27 Feb 2018

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.



ÉCOLE DOCTORALE 414 Vie et Santé

UMR 7156

THÈSE présentée par :

Antoine GILLMANN

soutenue le : **23 janvier 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Microbiologie

**Étude de la survie de contaminants bactériens modèles
d'origine industrielle, isolés d'environnements
oligotrophes, et élaboration de milieux synthétiques
permettant leur croissance**

THÈSE dirigée par :

Mme LETT Marie-Claire

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme BAUDA Pascale

Professeur, Université de Lorraine

Mme HIRSCHLER-REA Agnès

MCU,HDR, Université d'Aix-Marseille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. POTIER Serge

Professeur, Université de Strasbourg

M. CHOLLET Renaud

Responsable de recherche, Merck Millipore

Confidentiel

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le dispositif Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) pour avoir subventionné cette thèse.

Je remercie Yvan Tarassov et Philippe Bertin de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire GMGM ainsi que Damien Tuleu et Sébastien Ribault dans l'entreprise Merck Millipore.

Je remercie tout particulièrement Marie Claire Lett pour avoir dirigé ce travail de thèse. Ses conseils et sa gentillesse m'ont beaucoup apporté durant ces trois années. Merci également à Didier Lièvremont pour toutes les discussions que nous avons eues ainsi que sa convivialité.

Je remercie vivement Renaud Chollet qui a toujours su me conseiller et me motiver ainsi que pour sa bonne humeur.

Je remercie également Jessica Arnold avec qui travailler fut très enrichissant ainsi que pour sa sympathie. Merci à Laura, Julie, Charles Luc et Michael pour leur aide et leur enthousiasme.

Je remercie tous les membres du laboratoire GMGM pour les bons moments passés avec eux, notamment Sandrine, Florence, Jérémy, Julien et Fred ainsi que M. Kammerer.

Un grand merci à toute l'équipe de la R & D de Merck Millipore pour les excellentes conditions de travail qu'ils m'ont fournies ainsi que pour la bonne ambiance grâce notamment à Sophie Marisa, Marine, Céline, Mathilde, Anne, Fred², Gaétan, Sébastien, Christophe, Jean, Fabien...

Un énorme merci à mes parents, ma sœur et les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu. Merci à tous mes amis d'avoir toujours été présents.

Enfin, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

TABLE DES MATIERES

PARTIE I

I.	Introduction.....	1
A.	Présentation générale du travail de thèse	1
B.	Revue bibliographique	4
I.	La culture des micro-organismes	4
a)	Introduction.....	4
b)	Evolution des méthodes de culture	4
1)	Les origines des milieux de culture	4
2)	Formats utilisés	6
a.	Les milieux liquides.....	6
b.	Les milieux gélosés	6
3)	Les milieux complexes	7
4)	Les milieux synthétiques	8
c)	Utilisation des milieux de culture dans l'industrie	9
1)	Contrôle microbiologique des produits non stériles	9
a.	Essais de dénombrement microbien	9
b.	Recherche de micro-organismes spécifiés	10
2)	Contrôle microbiologique des produits stériles	11
d)	Les limites des méthodes de culture	11
1)	Les bactéries non cultivables.....	12
2)	Les bactéries non cultivables suite à un stress environnemental	13
a.	Stade viable mais non cultivable/dormance	14
b.	Le choc des nutriments	15
c.	Phénomènes stochastiques.....	15
II.	Le métabolisme bactérien	17
a)	Respiration versus fermentation.....	18
b)	Les principaux cycles du métabolisme central	19
1)	Les voies cataboliques	19
a.	La voie d'Embden-Meyerhof	20
b.	La voie des pentoses phosphates.....	22
c.	La voie d'Entner-Doudorof	23
d.	Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA)	24
2)	Les réactions anaboliques	26

c)	La nutrition	28
1)	Les macronutriments.....	28
2)	Les acides aminés	29
3)	Les bases azotées	31
4)	Les oligo-éléments (micronutriments)	32
5)	Importance des vitamines	33
d)	Paramètres physico-chimiques	34
1)	La température.....	35
2)	Influence du pH	35
3)	Oxygénation	36
a.	Les milieux aérobies	36
b.	Les milieux anaérobies	37
4)	Activité de l'eau/pression osmotique	37
a.	Augmentation intracellulaire des teneurs en sels dans le cytoplasme.....	39
b.	Synthèse d'osmolytes organiques.....	39
e)	Importance de la nutrition lors de croissance bactérienne	42
1)	Rôle primordial de la phase de latence.....	42
III.	Métabolisme particulier : cas des méthylotrophes	45
a)	Généralités sur les méthylotrophes	45
1)	Les méthanotrophes.....	46
2)	Les différents cycles utilisés	47
a.	Le cycle Calvin-Benson-Bassham.....	48
b.	Le cycle du ribulose monophosphate.....	50
c.	Le cycle de la sérine.....	52
d.	Le cycle du glyoxylate	54
3)	Utilisation de composés multi-carbonés.....	55
b)	<i>Methylobacterium sp.</i>	57
1)	Etude de <i>Methylobacterium extorquens</i>	58
a.	Métabolisme de <i>M. extorquens</i>	59
(i)	Fixation des molécules à un atome de carbone.....	59
(ii)	Oxydation du formaldéhyde	60
(iii)	Métabolisme central	61
(iv)	Le cycle Ethylmalonyl-CoA.....	63
b.	Utilisation de molécules multi-carbonées.....	63
(i)	Croissance sur acétate.....	64
(ii)	Croissance sur oxalate.....	66

(iii) Croissance sur des molécules à 3 et 4 atomes de carbone.....	67
(iv) Multi-consommation de molécules de carbone.	67
c. Plasticité du métabolisme	69
IV. Biofilm et interactions bactériennes	71
a) Communautés bactériennes retrouvées dans les eaux industrielles.....	72
b) Les différentes étapes de la formation d'un biofilm	73
1) L'adhésion des cellules	74
2) Formation des macro-colonies.....	75
3) Dispersion des cellules du biofilm	75
c) Les interactions intra/inter espèces.....	75
1) Interactions induites par le quorum sensing.....	76
2) Influence lors de la formation du biofilm.....	76
3) Rôle dans la dissémination.....	77
d) Autres types d'interactions simples	78
1) Interactions moléculaires	78
2) Interactions physiques : swarming et « hitchhiking »	79
e) Interactions synergiques	79
II. Matériels et méthodes	83
A. Préparation et évaluation des milieux synthétiques.....	83
I. Micro-organismes utilisés lors des expériences	83
a) Micro-organismes aérobies.....	84
b) Micro-organismes anaérobies.....	84
II. Milieux de culture utilisés.....	85
III. Préparation des milieux de culture synthétiques	86
a) Protocole du milieu synthétique MSaé	86
1) Les acides aminés	86
2) Les bases azotées	87
3) Les oligo-éléments.....	88
4) Autres constituants	88
5) Les vitamines	89
6) Finalisation du milieu	89
b) Protocole du milieu synthétique MSana	90
1) Les acides aminés :	90
2) Les bases azotées	91
3) Les oligo-éléments.....	92
4) Autres constituants	92

5)	Les vitamines	93
6)	Finalisation du milieu	93
c)	Milieu synthétique MScOA.....	94
1)	Solution 1.....	94
2)	Solution 2.....	94
3)	Sources de carbone testées dans le MScOA	95
d)	Préparation des milieux synthétiques dans un préparateur semi-industriel.....	95
B.	Les différentes techniques d'analyse de la croissance des micro-organismes	96
I.	Mesure de densité optique	96
a)	Lecteur de plaque Gemini©	96
b)	Lecteur de plaque Bioscreen©.....	96
II.	Cytométrie en flux	97
a)	Suivi d'une culture de <i>Methylobacterium sp.</i> en cytométrie	97
b)	Contrôle de la viabilité des bactéries	97
c)	Mesure par cytométrie en flux.....	97
III.	PCR semi-quantitative	98
a)	Lyse des micro-organismes	98
b)	Purification des acides nucléiques	98
c)	PCR en temps réel	98
C.	Méthodes d'analyse des composants des milieux complexes.....	99
I.	ICP-AES (Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)	99
a)	Préparation des échantillons.....	100
b)	Utilisation de l'ICP-AES	100
II.	Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Mass spectrometry (MS)	100
a)	Préparation des échantillons (dérivatisation AQC)	100
b)	Configuration de la chromatographie à phase liquide.....	101
D.	Molécules évaluées impactant la croissance bactérienne	101
III.	Résultats/Discussion.....	105
A.	Elaboration des milieux synthétiques	107
I.	Liste des micro-organismes	107
II.	Les milieux de culture référents	108
a)	Mise au point d'une formulation de base synthétique.....	110
III.	Les oligo-éléments	111
a)	Les différentes formes de métaux utilisés	112
1)	Limites de l'utilisation des poudres de métaux purs.....	112
2)	Avantages des sels métalliques	113

b)	Méthodes utilisées pour définir les concentrations d'oligo-éléments	114
1)	Analyse des milieux par ICP-AES.....	115
a.	Résultats obtenus	115
2)	Optimisation des concentrations suite aux analyses effectuées	117
c)	Formulation finale des oligo-éléments.....	119
d)	Conclusion/Discussion.....	119
IV.	Les acides aminés	120
a)	Evaluation d'un mélange commercial d'acides aminés prêt à l'emploi	120
b)	Importance de la dissolution des acides aminés.....	122
1)	Tests sur la solubilité des acides aminés	122
c)	Estimation de la quantité nécessaire en acides aminés.....	124
1)	Analyse de la concentration des acides aminés par UPLC-MS.....	126
2)	Comparaison de milieux avec acides aminés à un milieu contenant leurs précurseurs	127
d)	Formulation finale	129
e)	Conclusion/Discussion.....	130
V.	Les bases azotées	131
a)	Sélection des bases azotées	131
b)	Impact de la dissolution des bases azotées.....	131
c)	Estimation des concentrations en bases azotées par tests croisés.....	133
d)	Formulation finale	134
e)	Conclusion/Discussion.....	134
VI.	Les Vitamines	135
a)	Différences de solubilité.....	135
1)	Vitamines hydrosolubles	135
2)	Vitamines non hydrosolubles.....	135
b)	Identification des vitamines nécessaires à la croissance bactérienne	136
c)	Détermination de la concentration en vitamines par comparaison des concentrations présentes dans les peptones et extraits de levure.....	138
d)	Composition actuelle.....	140
e)	Conclusion/Discussion.....	141
VII.	Préparation des milieux synthétiques.....	142
a)	Formation de précipités lors de la réalisation des milieux.....	142
1)	Précipitation des sels.....	142
b)	Préparateur semi-industriel	143
c)	La filtration	143

VIII. Performances des milieux synthétiques sur le panel de micro-organismes	144
a) Milieu synthétique aérobie	144
b) Milieu synthétique anaérobie	145
IX. Milieu synthétique pour <i>Methylobacterium extorquens</i>	146
a) Les différents milieux synthétiques testés	146
b) Evaluation de différentes techniques d'analyse de croissance chez <i>M. extorquens</i>	148
1) Analyse de la DO par lecteur de plaque	148
2) Comptage des bactéries par cytométrie en flux	148
3) PCR en temps réel	150
c) Comparaison des sources de carbone utilisées par <i>M. extorquens</i>	152
1) Assimilation d'une seule source de carbone	152
2) Combinaison de plusieurs sources de carbone	154
d) Conclusion/Discussion	156
X. Finalisation des milieux synthétiques	157
a) Etude des souches anaérobies.	157
1) Effet bénéfique de l'hémine	157
2) Cas de <i>P. acnes</i>	158
b) Etude des souches aérobies	159
1) Dilution des milieux	159
160	
c) <i>M. extorquens</i> vs <i>S. epidermidis</i>	160
1) Influence de la bêtaïne sur la croissance de <i>M. extorquens</i>	160
2) Impact de l'acide oléique sur <i>S. epidermidis</i>	161
d) Performances actuelles du milieu Msaé	161
e) Formulations définitives des milieux Msaé et MSana	164
f) Conclusion/Discussion	166
B. Evaluation de molécules pouvant impacter la croissance bactérienne	167
I. L'acide diaminopimélique.....	168
II. L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC).....	170
III. Précurseurs métaboliques	171
a) L'oxaloacétate	171
b) Le pyruvate	172
IV. Les catécholamines	174
V. Les flavonoïdes.....	175
VI. Les auxines.....	177
VII. Les terres rares.....	178

C.	Étude de la survie de micro-organismes dans les systèmes d'eau industriels.....	180
I.	Article soumis pour publication	181
IV.	Conclusions et Perspectives	217
V.	Annexes	227
I.	Annexe 1 :	227
II.	Annexe 2	229
III.	Annexe 3	229
IV.	Annexe 4	230
V.	Annexe 5	231
VI.	Annexe 6	232
VII.	Annexe 7	233
VIII.	Annexe 8	234
IX.	Annexe 9	235
X.	Annexe 10	236
XI.	Annexe 11	237
XII.	Annexe 12	238
VI.	Bibliographie.....	241

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Composition du milieu Sabouraud Dextrose Agar.....	7
Figure 2 : Composition du milieu synthétique de <i>Clostridium thermocellum</i>	8
Figure 3 : Interactions avec les bactéries non cultivables lors de co-cultures	13
Figure 4 : Première partie des réactions du cycle d'Embden-Meyerhof.....	20
Figure 5 : Deuxième partie des réactions du cycle d'Embden-Meyerhof.....	21
Figure 6 : Voie des pentoses phosphates.....	22
Figure 7 : Voie d'Entner-Doudorof.....	23
Figure 8 : Décarboxylation du pyruvate puis addition d'une coenzyme A formant une molécule d'acétyl-CoA.....	24
Figure 9 : Cycle des acides tricarboxyliques chez les procaryotes.....	25
Figure 10 : Représentation du métabolisme central bactérien.....	27
Figure 11 : Représentation des métabolites précurseurs à l'origine d'acides aminés chez <i>Escherichia Coli</i>	30
Figure 12 : Bases pyrimidiques.....	31
Figure 13 : Bases puriques.....	31
Figure 14 : Capture du dioxygène par le thioglycolate de sodium	37
Figure 15 : Activité de l'eau minimum nécessaire à la croissance des bactéries énoncées.....	38
Figure 16 : Système d'osmorégulation chez <i>Escherichia coli</i>	41
Figure 17 : Etat de la cellule bactérienne lors des différentes phases de croissance.....	44
Figure 18 : Représentation simplifiée des différents « modules » retrouvés dans la méthylotrophie.....	47
Figure 19 : Première étape du cycle de Calvin.....	48
Figure 20 : Premières étapes du cycle RuMP.....	50
Figure 21 : Métabolisme central simplifié des méthanotrophes utilisant le Cycle RuMP.....	51
Figure 22 : Métabolisme central simplifié des méthanotrophes utilisant le cycle de la Sérine.....	53
Figure 23 : Cycle du glyoxylate.....	55
Figure 24 : Assimilation de différentes sources de carbone chez le méthanotrophe <i>Methylocystis</i> strain SB2.....	56
Figure 25 : Réactions permettant la formation de formaldéhyde à partir de méthylamine ou de méthanol.....	59
Figure 26 : Oxydation spontanée du formaldéhyde avec une molécule de tétrahydrofolate.....	60
Figure 27 : Assimilation du formaldéhyde par <i>Methylobacterium extorquens</i>	61

Figure 28 : Métabolisme central de <i>Methylobacterium extorquens</i>	62
Figure 29 : Métabolisme de <i>M. extorquens</i> lors de la croissance sur acétate.....	65
Figure 30 : Voie supposée de l'assimilation de l'oxalate chez <i>M. extorquens</i>	66
Figure 31 : Co-assimilation de méthanol et de succinate dans le métabolisme central de <i>M. extorquens</i>	69
Figure 32 : Exemple d'un système de purification de l'eau utilisé dans le milieu pharmaceutique.....	71
Figure 33 : arbre phylogénétique des différentes espèces retrouvées dans un circuit d'eau ultra-pure.....	72
Figure 34 : Les cinq étapes de formation d'un biofilm.....	74
Figure 35 : Quorum sensing de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i>	77
Figure 36 : Détection visuelle du début de croissance des souches <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>C. albicans</i> dans les milieux TSB et MSaé.....	113
Figure 37 : Détection visuelle du début de croissance des souches <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>C. albicans</i> dans les milieux TSB, MSaé et MSaé II.....	117
Figure 38 : Composition en acides aminés du mélange commercialisé par Sigma©.....	120
Figure 39 : Effet de la concentration en acides aminés sur la croissance d' <i>E. coli</i>	121
Figure 40 : Quantités relatives (unité abstraite) des acides aminés (aa) déterminées dans différents milieux de culture par UPLC.....	126
Figure 41 : Croissance d' <i>E. coli</i> par détection visuelle dans le milieu MSaé suivant les concentrations des bases azotées.....	133
Figure 42 : Croissance d' <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>S. epidermidis</i> par détection visuelle dans des milieux synthétiques contenant des compositions différentes en vitamines.....	137
Figure 43 : Croissance de <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>S. epidermidis</i> dans les trois milieux MSaé et TSB.....	140
Figure 44 : Composition du milieu MSCoA pour <i>Methylobacterium extorquens</i>	147
Figure 45 : Graphique représentant les éléments en fonction de leur taille et de leur granulosité dans le milieu TSB ½.....	149
Figure 46 : Croissance de <i>M. extorquens</i> dans du milieu R2B et TSB dilué de moitié.....	150
Figure 47 : Résultats de la Q-PCR indiquant la quantité d'ADN de <i>M. extorquens</i> présente dans des échantillons prélevés à différents temps dans les milieux R2B, MSCoA + pyruvate et MSCoA + méthylamine.....	151
Figure 48 : Courbes de croissance obtenues par lecture de densité optique toutes les heures pour <i>M. extorquens</i> dans le milieu MSCoA contenant du pyruvate ou du pyruvate + méthylamine comme source de carbone.....	155
Figure 49 : Courbe de croissance de <i>M. extorquens</i> dans le milieu TSB et le milieu MSaé finalisé.....	162
Figure 50 : Courbe de croissance de <i>S. epidermidis</i> dans le milieu TSB et le milieu MSana finalisé.....	162
Figure 51 : Croissance de <i>S. epidermidis</i> dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations de DAP.....	170

Figure 52 : Croissance de <i>M. extorquens</i> dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations d'AMPc.....	171
Figure 53 : Croissance de <i>M. extorquens</i> dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations d'oxaloacétate.....	172
Figure 54 : Croissance de <i>S. epidermidis</i> dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations de pyruvate.....	173
Figure 55 : Croissance d' <i>E.coli</i> dans le milieu TSB ½ contenant différentes flavonoïdes.....	176
Figure 56 : Croissance de <i>M. extorquens</i> dans le milieu MScOA contenant différentes auxines.....	177

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Milieux de culture recommandés par la Pharmacopée européenne pour la détection de micro-organismes spécifiés.....	10
Tableau 2 : Macroéléments nécessaires à la croissance bactérienne.....	29
Tableau 3 : Fonctions des principaux oligo-éléments.....	32
Tableau 4 : Sources de carbone assimilées par différentes souches de <i>Methylobacterium</i>	58
Tableau 5 : Liste des micro-organismes testés afin d'évaluer les performances des milieux synthétiques.....	107
Tableau 6 : Sels d'oligo-éléments utilisés pour remplacer les poudres de métaux.....	114
Tableau 7 : Liste des 20 échantillons analysés par ICP-AES.....	115
Tableau 8 : Résultats de l'analyse de la concentration des oligo-éléments par ICP-AES des milieux TSB, MSaé avec sels de métaux et MSaé sans ajout de métaux.....	116
Tableau 9 : Croissance de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> et <i>B. subtilis</i> en présence de différentes concentrations de fer.....	118
Tableau 10 : Dissolution de 100 mg d'acides aminés dans l'eau.....	123
Tableau 11 : composition en acides aminés du milieu synthétique pour <i>C. sporogenes</i>	125
Tableau 12 : Croissance de <i>C. sporogenes</i> dans le milieu FTM en comparaison avec le MSana.....	125
Tableau 13 : Composition en acides aminés de différents milieux synthétiques.....	128
Tableau 14 : Performance des milieux synthétiques dont la composition en aa est décrite tableau 12.....	129
Tableau 15 : Solubilisation des bases azotées.....	132
Tableau 16 : Gamme de concentration permettant d'évaluer la concentration de chaque base azotée.....	134
Tableau 17 : Composition en vitamines des milieux synthétiques MSaé, MSaé I et MSaé II.....	137
Tableau 18 : Concentrations en vitamines des milieux MSaé, MSaé II et MSaé III.....	139
Tableau 19 : Composition en vitamines du milieu synthétique.....	140
Tableau 20 : Performances du milieu MSaé sur les bactéries aérobies.....	144
Tableau 21 : Performances du milieu MSana sur les bactéries anaérobies.....	145
Tableau 22 : Sources de carbone testées dans le MSCoA pour l'étude de la croissance de <i>M. extorquens</i>	152
Tableau 23 : Evaluation de la croissance par détection visuelle de <i>M. extorquens</i> dans le milieu MSCoA contenant différentes sources de carbone.....	153

Tableau 24 : Performances du milieu MSana avec et sans ajout d'hémine sur la liste de souches anaérobies.....	157
Tableau 25 : Croissance de <i>M. extorquens</i> dans le milieu MSaé comportant différentes dilutions de la famille d'acides aminés (aa), de sels et de bases azotées (ba).....	160
Tableau 26 : Croissance des souches du panel dans la nouvelle formulation du milieu MSaé.....	163
Tableau 27 : Formulations définitives des milieux synthétiques.....	165
Tableau 28 : Temps nécessaires pour l'obtention d'une valeur de DO de 0.1 en lecteur de plaque de <i>M. extorquens</i> dans le milieu MSCoA contenant différentes concentrations de terres rares.....	178

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	acide aminé
ba	base azotée
AHL	Acyl Homosérine Lactone
AI	Autoinducteur
ChIP-chip	Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip (Puce à ADN)
CLHP	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
COS	Milieu Columbia au sang
DO	Densité optique
EMPC	Cycle Ethylmalonyl-CoA
FSC	Forward Scatter
FTM	Milieu Fluid Thioglycollate Medium
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
ICP-AES	Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy
MSaé	Milieu Synthétique aérobie
MSana	Milieu Synthétique anaérobie
MSCoA	Milieu Synthétique défini pour la croissance de <i>Methylobacterium extorquens</i>
PABA	Para-AminoBenzoic Acid
Q-PCR	Real-time Polymerase Chain Reaction
QS	Quorum sensing
QSP	Quantité Suffisante Pour
R2A	Milieu Reasoner's 2A agar
R2B	Milieu Reasoner's 2A sans agar
SDA	Milieu Sabouraud Dextrose Agar
SSC	Side Scatter
TSA	Milieu Trypcase Soy Agar
TSB	Milieu Trypcase Soy Broth
UFC	Unité formant colonie
UPLC-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
UPW	Ultra Pure Water

PARTIE I

INTRODUCTION

I. Introduction

A. Présentation générale du travail de thèse

Les entreprises pharmaceutiques et cosmétiques se doivent de garantir la stérilité de leurs produits finis. Les industries agroalimentaires quant à elles doivent assurer l'absence de micro-organismes pathogènes avant la commercialisation de leurs produits. Pour ce faire, des contrôles microbiologiques sont effectués tout au long des procédés de fabrication. Malgré les nombreuses actions mises en place afin d'éviter toute contamination, il arrive que des micro-organismes soient isolés de manière sporadique. Ces contaminants peuvent être apportés lors des manipulations, par le biais des matières premières, voire par l'eau utilisée pour la fabrication de ces produits. Ces contaminants bactériens sont problématiques pour les industriels car ils peuvent représenter des pertes considérables. En effet, si la présence d'un micro-organisme est détectée dans un produit fini, le lot entier devra être retiré de la vente. Les entreprises ont recours à différents tests microbiologiques leur permettant d'évaluer le taux de contamination de leurs produits et utilisent généralement des milieux de culture complexes, permettant la croissance des micro-organismes. Ces milieux de culture doivent garantir la croissance d'un maximum de contaminants et cela de manière reproductible. Cependant, ces milieux de culture complexes, validés par les instances réglementaires, n'ont que peu évolués depuis de nombreuses années. De ce fait, ces milieux ne sont pas forcément adaptés à certains contaminants ayant survécus à un environnement hostile, ainsi qu'aux nombreux stress causés par les processus de décontaminations.

Ces contaminants microbiens isolés des milieux industriels constituent le point de départ du travail de recherche effectué pendant la thèse. L'étude de leur processus de survie doit contribuer à l'élaboration d'une combinaison de milieux synthétiques permettant à la fois la croissance du plus grand nombre de ces contaminants et leur utilisation par les industries. Ces milieux seront des milieux synthétiques liquides, qui permettront de garantir à leurs utilisateurs leurs performances ainsi que la reproductibilité des résultats.

Le travail de recherche a été divisé en deux axes principaux. Le premier axe consiste à élaborer deux milieux de culture synthétiques, l'un aérobie et l'autre anaérobie qui devront favoriser la croissance de ces micro-organismes stressés, à croissance habituellement lente. Le deuxième axe traitera de l'étude de contaminants bactériens isolés de l'industrie afin d'apporter des éléments de compréhension sur les mécanismes de survie dans des milieux extrêmement pauvres en nutriments. L'étude de ces contaminants pourra également permettre l'identification de facteurs de croissance pouvant être utilisés pour compléter les milieux synthétiques développés dans le premier axe.

Les milieux de culture synthétiques sont des milieux dont la composition est totalement définie. Ils doivent permettre la croissance du plus grand nombre de contaminants potentiellement retrouvés dans l'industrie. Une liste minimum de micro-organismes décrits par les instances réglementaires a été définie, composée de micro-organismes variés, afin de pouvoir évaluer les performances des milieux synthétiques. Celles-ci seront comparés à deux milieux liquides de référence largement utilisés dans les industries pharmaceutiques et biotechnologiques : le Tryptic Soy Broth (TSB, milieu aérobie) et le Fluid Thioglycollate Medium (FTM, milieu anaérobie). La mise au point d'un milieu synthétique comprend trois aspects : la formulation, la dissolution des composants et la procédure de préparation du milieu. La formulation est certainement l'axe le plus complexe. En effet, cette dernière doit être la plus précise possible afin de fournir les bons nutriments aux micro-organismes, dans des concentrations les plus adéquates possibles, afin de garantir une croissance satisfaisante. La dissolution des composés doit permettre l'assimilation de ces derniers par les cellules. Enfin, la préparation doit limiter les interactions entre les composés afin d'éviter les précipités et obtenir un milieu limpide. De plus, la préparation doit être réalisable à l'échelle industrielle.

Le deuxième axe de recherche se focalise sur l'étude et la compréhension du métabolisme des micro-organismes retrouvés dans les systèmes d'eau des industries. Ces organismes résistent à des conditions drastiques dues aux différents systèmes de purification de l'eau ainsi qu'aux très faibles quantités de nutriments disponibles. De ce fait, les cellules subissent de nombreux stress et peuvent se trouver dans un stade physiologique de dormance. L'adaptation de ces bactéries à un milieu contenant une concentration plus forte en nutriments peut être longue rendant leur isolement, en microbiologie traditionnelle, plus

fastidieuse et non garantie. A ce sujet, des études ont montré que certaines molécules pouvaient modifier la physiologie de bactéries stressées (Brewer *et al.*, 1977; Bruns *et al.*, 2002; Freestone *et al.*, 2007). C'est pourquoi, l'ajout de molécules dans le milieu pouvant stimuler la croissance bactérienne ou favoriser l'adaptation à ces nouvelles conditions semble être une piste prometteuse et mérite d'être investiguée.

Il a également été démontré que la formation de biofilms (communauté de cellules bactériennes, polysaccharides, ADN et protéines permettant la fixation à une surface rigide) permet aux bactéries de résister à de nombreux stress. Ces structures complexes ont été retrouvées à l'intérieur des systèmes d'eau industriels. Il est donc probable que certains contaminants retrouvés proviendraient de biofilms, avant de s'en être détachés. L'étude des mécanismes de communication mis en place par ces bactéries au sein du biofilm représente également une piste intéressante car elle pourrait mener à l'identification de molécules clés utilisables pour compléter les milieux de culture.

La partie I de la revue bibliographique retrace les étapes principales de l'histoire de la culture des micro-organismes et présente les différents types de milieux de culture ainsi que les limites et biais de leurs utilisations. La partie II exposera ensuite les bases nécessaires à la compréhension du métabolisme bactérien ainsi que les éléments nutritionnels et les paramètres physico-chimiques indispensables à la croissance microbienne. La partie III expliquera plus en détails le métabolisme particulier de contaminants souvent retrouvés et difficiles à cultiver, les méthylotrophes. Enfin, la partie IV présentera les notions importantes des interactions inter-espèces pouvant être déterminées au sein d'un biofilm.

B. Revue bibliographique

I. La culture des micro-organismes

a) *Introduction*

Il serait difficile d'introduire la culture des micro-organismes sans parler de Robert Hooke et Antoni van Leeuwenhoek, précurseurs de la microbiologie. Robert Hooke (1635-1703) est le premier à avoir observé et dessiné des micro-organismes en 1665. Il s'agissait de moisissures du genre *Mucor* qui se développaient sur un morceau de cuir. Le dessin fut publié dans son ouvrage *Micrographia* contenant de nombreuses illustrations de ses observations microscopiques (pour revue voir (Gest, 2004)). Onze ans plus tard, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) observe pour la première fois des bactéries (Porter, 1976). Van Leeuwenhoek était un maître drapier hollandais qui créa de petits microscopes très primitifs afin d'observer la qualité de ses tissus. Etant de nature curieuse, il se mit à observer une multitude de choses à l'aide des microscopes de sa propre fabrication. Il décida d'observer une infusion de poivre dans le but de comprendre pourquoi le goût de cette épice était si prononcé. Lors d'observations successives de cette infusion, il décrivit des cellules qui n'étaient pas présentes dans l'infusion trois semaines plus tôt qu'il dénomma « animalcules » (pour revue voir (Gest, 2004)). Antoni van Leeuwenhoek fit part de toutes ses observations dans des lettres qu'il envoya à la Société Royale de Londres. Ces lettres seront rendues publiques en 1684. Malgré ces premières observations de micro-organismes, il faudra attendre le XIX^e siècle pour voir apparaître l'essor de la microbiologie notamment grâce aux découvertes de Ferdinand Cohn et Louis Pasteur.

b) *Evolution des méthodes de culture*

1) Les origines des milieux de culture

Le médecin Robert Koch (1843-1910) est connu pour ses postulats qui l'ont rendu célèbre. Les postulats de Koch comportent quatre critères nécessaires à prouver qu'un micro-

organisme défini est la cause d'une maladie spécifique. En effet, les postulats stipulent que le micro-organisme doit être présent chez l'animal malade et non chez l'animal sain. Pour vérifier ce critère, des échantillons de l'animal malade et de l'animal sain doivent êtreensemencés en culture pure. Les micro-organismes cultivés provenant de l'animal malade doivent pouvoir contaminer à nouveau un animal sain puis être à nouveau isolés pour prouver que cet organisme est responsable de la maladie (Koch, 1932). De ce fait, Koch a dû mettre au point des méthodes permettant d'obtenir des cultures pures. Le médecin va d'abord utiliser des tranches de pomme de terre pour cultiver les premières bactéries. Même si certaines espèces se développent sur ces premiers milieux de culture, Koch cherche à mettre au point d'autres techniques permettant la croissance d'un plus grand nombre de micro-organismes. Il va rapidement utiliser de la gélatine pour ses qualités nutritionnelles plus intéressantes et recouvrir les milieux d'une cloche de verre afin de les protéger des contaminations. Cependant, la gélatine se liquéfie au-dessus de 30°C et ne supporte pas les températures idéales d'incubation de nombreuses bactéries.

Walter Hesse (1846-1911), un élève de Robert Koch, était également confronté à la liquéfaction de la gélatine lors de ses études sur les contaminants de l'air et de l'eau. Il demanda à sa femme Lina pourquoi ses gelées de fruits résistaient aux températures de cuisson. La résistance à la chaleur était due à l'agar-agar, polymère de galactose présent dans certaines algues rouges. Les résultats furent sensationnels car l'utilisation d'agar permettait aux milieux de culture de retrouver une forme solide après l'étape de stérilisation (pour revue voir (Hesse, 1992).

Un autre fait marquant dans l'histoire du milieu de culture est l'invention de la boîte de Petri en 1887 par Julius Richard Petri (1852-1921). Ce microbiologiste allemand eu l'idée d'utiliser des boîtes à double face en verre pour y couler les milieux de culture. Ces dernières peuvent être facilement stérilisées indépendamment du milieu de culture et facilement stockables (pour revue voir (Madigan, 2005). Toutes ces découvertes servent encore de base à la réalisation des milieux de culture actuels.

2) Formats utilisés

Un milieu de culture est une solution constituée de nutriments permettant la croissance de micro-organismes. Il peut être utilisé sous deux formes : la forme liquide, principalement stockée en bouteilles ou Erlenmeyers, et la forme solide/gélosée stockée dans des boîtes de Petri. Le choix du format dépend de l'utilisation désirée.

a. Les milieux liquides

Les milieux de culture sous forme liquide sont les plus simples à préparer. Les nutriments adéquats requis pour le développement des micro-organismes sont mélangés à de l'eau distillée. Après ajustement du pH, le milieu est stérilisé, la plupart du temps par autoclave (moyen de stérilisation générant de la vapeur saturante). Les nutriments sont alors totalement dissous et le milieu obtenu est limpide. Cela permet d'observer la croissance des micro-organismes à l'œil nu (formation d'un trouble) ou de suivre l'évolution de la croissance par analyse de la turbidité ou prise de densité optique (DO). Un milieu liquide permet également de nombreuses autres applications comme la conservation des organismes après cryogénéisation.

b. Les milieux gélosés

Les milieux gélosés ont la même formulation que les milieux liquides mais comprennent en plus un agent gélifiant. L'agent gélifiant le plus communément utilisé est l'agar. Il peut se décliner sous trois formes, l'agar noble, l'agar-agar et l'agar, cités par ordre décroissant de pureté. D'autres agents gélifiants peuvent être incorporés comme de la gomme de guar ou de la gellane. Au niveau de la préparation, l'agent gélifiant est ajouté avant la phase d'autoclavage. Il est préconisé de le faire préalablement bouillir afin d'obtenir une incorporation homogène au milieu de culture. Une fois autoclavé, quand la température se situe aux alentours de 50 °C, le milieu est coulé dans des boîtes de Petri ou des tubes en verre (gélose en pente). Grâce à l'agent gélifiant, le milieu va se solidifier aux alentours de 40°C. Notons que la gélose peut être plus ou moins molle selon la quantité d'agent gélifiant ajoutée. Les milieux de culture gélosés offrent une structure nutritive solide pour les micro-organismes. De ce fait, les bactéries ne peuvent pas se déplacer et vont se développer sous forme de

colonies. Les formes et couleurs des colonies étant différentes selon les espèces, il est ainsi facile de les différencier et de les isoler. Les milieux solides ont d'autres avantages comme l'étude de caractéristiques physiologiques ou le transport et la conservation des souches à basses températures.

3) Les milieux complexes

La deuxième partie de la revue bibliographique décrira les nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes. La composition en nutriments peut être très différente selon les milieux de culture. Chaque espèce a des exigences nutritionnelles particulières. De ce fait, il n'existe pas de milieu dit « universel » permettant la croissance de tous les micro-organismes. La composition des milieux est donc spécifique à la croissance d'un groupe de micro-organismes. Pour répondre à ces besoins nutritionnels, deux types de milieux sont utilisables. Les milieux complexes sont les milieux les plus fréquemment utilisés car faciles à préparer et souvent peu coûteux. Ils sont constitués de composés tels l'extrait de levure, des peptones d'origines animales ou végétales ou des protéines comme la caséine (protéine extraite du lait). Ces composés sont préalablement digérés par des enzymes protéolytiques. Leur composition est notamment riche en acides aminés et en vitamines. Le plus souvent, ces digestions suffisent à fournir les éléments nutritifs nécessaires s'ils sont accompagnés d'une source de carbone servant à générer de la matière organique. La **figure 1** expose la composition d'un milieu gélosé, le milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Ce milieu utilisé pour la croissance de champignons n'est composé que de digestions enzymatiques et d'une source de carbone, le dextrose. La composition de ces hydrolysats n'est pas complètement définie et peut varier d'un lot à l'autre. Les milieux complexes ont donc le désavantage de ne pas être reproductibles.

Pour 1 litre de milieu :

- Dextrose	40,0 g
- Digestat pancréatique de tissus animaux	5,0 g
- Digestat pancréatique de caséine	5,0 g
- Gélose	15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,6 ± 0,2.

Figure 1 : Composition du milieu Sabouraud Dextrose Agar. Le milieu est composé d'une source de carbone et de digestions enzymatiques (www.solabia.fr).

4) Les milieux synthétiques

La composition d'un milieu synthétique est, quant à elle, clairement définie. Les hydrolysats sont remplacés par les molécules purifiées nécessaires à la croissance des micro-organismes ciblés. La concentration de chaque molécule est définie permettant de répondre au mieux aux exigences nutritives. Ces milieux sont reproductibles et leurs performances sont identiques selon les préparations. Les bactéries peu exigeantes capables de synthétiser la plupart des composés nécessaires à leur croissance ne requièrent que peu de molécules. A l'inverse, les bactéries exigeantes nécessitent un milieu synthétique riche en diverses molécules comme le milieu pour *Clostridium thermocellum* représenté **figure 2**.

Name	Chemical formula	Concentration (g/l)
<i>Carbon and energy source</i>		
Avicel PH105 ^b	[C ₆ H ₁₀ O ₅] _n	5.0
Cellobiose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	5.0
<i>Buffers, chelating agents and salts</i>		
Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS) ^{c,d}	C ₇ H ₁₄ NNaO ₄ S	(5.0)
Resazurin	C ₁₂ H ₆ NNaO ₄	1.0E-03
Monopotassium phosphate	KH ₂ PO ₄	0.0
Dipotassium phosphate	K ₂ HPO ₄	1.0
Citric acid tripotassium salt	C ₆ H ₅ O ₇ K ₃	2.0
Citric acid monohydrate	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	1.25
Sodium sulfate	Na ₂ SO ₄	1.0
Sodium bicarbonate	NaHCO ₃	2.5
<i>Nitrogen source</i>		
Ammonium chloride	NH ₄ Cl	1.5
Urea	CH ₄ N ₂ O	2.0
<i>Salts and reducing agent</i>		
Magnesium chloride hexahydrate	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1
Calcium chloride dihydrate	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2
Ferrous chloride tetrahydrate	FeCl ₂ ·4H ₂ O	0.1
Ferrous sulfate hepta hydrate	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0
L-cysteine hydrochloride monohydrate	C ₃ H ₇ NO ₂ S·HCl·H ₂ O	1.0
<i>Vitamins</i>		
Pyridoxamine Dihydrochloride	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ ·2HCl	0.02
PABA	C ₇ H ₇ NO ₂	0.004
D biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0.002
Vitamin B-12	C ₆₃ H ₈₈ CoN ₁₄ O ₁₄ P	0.002

Figure 2 : Composition du milieu synthétique de *Clostridium thermocellum*. Le milieu est composé de 21 molécules nécessaires à la croissance de la bactérie, regroupées en différentes catégories (Holwerda *et al.*, 2012).

La préparation d'un milieu comme celui ci-dessus peut-être longue et minutieuse. Le coût est également plus élevé expliquant l'utilisation des milieux synthétiques seulement dans des cas précis notamment lorsque les micro-organismes ne se développent pas sur des milieux complexes. De ce fait, il n'existe pas de milieu synthétique permettant la croissance de micro-organismes diversifiés comme le font beaucoup de milieux complexes. L'intérêt d'un tel milieu serait la garantie de la reproductibilité des performances de ce dernier.

c) *Utilisation des milieux de culture dans l'industrie*

Le milieu industriel notamment pharmaceutique et agro-alimentaire consomme de grandes quantités de milieux de culture. Ces derniers sont majoritairement utilisés pour la surveillance microbiologique. Les milieux peuvent être utilisés pour la recherche de contaminants précis comme les coliformes, *Listeria sp.*, *Staphylococcus sp.* etc., ainsi que pour évaluer la contamination totale des produits avant commercialisation, du matériel utilisé pour la préparation de ces produits ainsi que la contamination de l'air dans les salles de préparation.

1) Contrôle microbiologique des produits non stériles

La Pharmacopée (dans notre cas européenne) préconise les milieux de culture nécessaires selon les utilisations. Notons que d'autres méthodes microbiologiques que celles recommandées par la Pharmacopée peuvent être utilisées si leur équivalence avec la méthode de la Pharmacopée est démontrée.

a. Essais de dénombrement microbien

Le chapitre 2.6.12 de la Pharmacopée européenne décrit le processus à utiliser pour le dénombrement de la flore totale, c'est-à-dire des bactéries mésophiles, moisissures et levures aérobies. La technique recommandée est la filtration sur membrane de l'échantillon à évaluer. Pour dénombrer les micro-organismes totaux, la membrane doit être déposée sur gélose TSA. Pour le dénombrement des levures/moisissures, la membrane est déposée sur milieu SDA (Pharmacopée 2.6.12).

b. Recherche de micro-organismes spécifiés

Le chapitre 2.6.13 de la Pharmacopée européenne traite de la recherche de germes spécifiques. Le **tableau 1** montre les milieux recommandés par la Pharmacopée européenne en fonction des micro-organismes à détecter. Certains milieux permettent également l'inhibition de certains micro-organismes, facilitant l'identification des contaminants recherchés.

	Milieu	Propriétés	Microorganisme de référence
Recherche des bactéries gram-négatives résistantes aux sels biliaires	Milieu d'enrichissement pour les entérobactéries Mossel	Fertilité	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
		Inhibition	<i>S. aureus</i>
	Milieu gélosé à la bile-violet-rouge avec glucose	Fertilité + indication	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>
Recherche d' <i>Escherichia coli</i>	Milieu liquide de MacConkey	Fertilité	<i>E. coli</i>
		Inhibition	<i>S. aureus</i>
	Milieu gélosé de MacConkey	Fertilité + indication	<i>E. coli</i>
Recherche des salmonelles	Milieu liquide d'enrichissement pour les salmonelles Rappaport-Vassiliadis	Fertilité	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium ou <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Abony
		Inhibition	<i>S. aureus</i>
	Milieu gélosé xylose-lysine-désoxycholate	Fertilité + indication	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Typhimurium ou <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sérovar Abony
Recherche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Milieu gélosé-cétrimide	Fertilité	<i>P. aeruginosa</i>
		Inhibition	<i>E. coli</i>
Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	Milieu gélosé mannitol-sel	Fertilité + indication	<i>S. aureus</i>
		Inhibition	<i>E. coli</i>
Recherche des clostridies	Milieu renforcé pour clostridies	Fertilité	<i>Cl. sporogenes</i>
	Gélose Columbia	Fertilité	<i>Cl. sporogenes</i>
Recherche de <i>Candida albicans</i>	Milieu liquide Sabouraud dextrosé	Fertilité	<i>C. albicans</i>
	Milieu Sabouraud dextrosé-gélosé	Fertilité + indication	<i>C. albicans</i>

Tableau 1 : Milieux de culture recommandés par la Pharmacopée européenne pour la détection de micro-organismes spécifiés. Chapitre 2.6.13.1

Les milieux décrits sont des milieux complexes dont la composition est relativement simple, comprenant au maximum une dizaine de composés dont de l'extrait de levures et/ou des peptones.

2) Contrôle microbiologique des produits stériles

Pour contrôler les produits dont la stérilité doit être garantie, le chapitre de la Pharmacopée 2.6.1 préconise, si le produit à analyser est liquide, la filtration sur membrane de l'échantillon puis le dépôt de la membrane dans milieu de culture liquide. Pour la détection de tous les micro-organismes aérobies, le milieu TSB est préconisé. Pour les micro-organismes anaérobies, il s'agit de milieu FTM. Seuls ces deux milieux complexes sont recommandés pour le test de stérilité.

De ce fait, la Pharmacopée européenne ne recommande aux industries pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires qu'une gamme de milieux de culture très restreinte. De plus, aucun milieu synthétique n'est encore recommandé, même pour l'identification de contaminants précis. La Pharmacopée européenne est très peu souvent mise à jour ou modifiée, signifiant que les milieux recommandés ne sont plus forcément les milieux les plus adéquats pour les applications décrites. Cela laisse cependant des opportunités pour le développement de nouveaux milieux de culture qui, si leur performance est reconnue, pourront peut-être d'ici quelques années être cités par la Pharmacopée européenne.

d) *Les limites des méthodes de culture*

Ces différents types de milieux ne favorisent que la croissance d'un certain nombre de micro-organismes. Achtman et Wagner estiment que seulement 7031 espèces de procaryotes ont été identifiées et isolées sur milieux en boîte de Petri (Achtman and Wagner, 2008). Etant donné que les procaryotes présents sur terre seraient de l'ordre de 10^{30} cellules (Whitman *et al.*, 1998), l'efficacité des milieux de culture reste encore très limitée. Des techniques de biologie moléculaire comme le séquençage des gènes codant l'ARN 16S et l'analyse de métagénomés permettent de nos jours d'identifier certaines bactéries non cultivables sur milieux (Sleator *et al.*, 2008). Cependant, de nombreux progrès restent à faire pour rendre possible la culture de ces bactéries tant dans la formulation que dans la conception des milieux. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer les limites de l'utilisation des milieux de culture :

1) Les bactéries non cultivables

Les bactéries non cultivables (NC) sont des bactéries qui ne se développent pas dans les conditions de culture utilisées en laboratoire car ces dernières ne reflètent pas les aspects essentiels de l'environnement de ces bactéries (Stewart, 2012). Ces paramètres englobent les nutriments mais également les paramètres physico-chimiques (voir partie II de la revue bibliographique). La présence de ces bactéries peut être mise en évidence car elles sont observables au microscope et leur ADN peut être extrait et séquencé. Deux stratégies sont actuellement utilisées afin de permettre la croissance des bactéries non cultivables. La première stratégie consiste à mimer l'environnement des bactéries. Cette technique est difficile à mettre en place car il n'est pas évident de reproduire les conditions à l'identique. Pour pallier ce problème, des systèmes contenant des membranes séparant les bactéries de leur environnement ont été mis au point. De ce fait, les bactéries peuvent puiser les nutriments de leur environnement à travers les pores de la membrane et se développer sur la surface de cette dernière, les rendant ainsi accessibles aux microbiologistes (Ferrari *et al.*, 2008; Kaeberlein *et al.*, 2002).

La deuxième technique repose sur la co-culture de bactéries. Il a été observé que certaines bactéries isolées par la méthode précédente, ne se développaient sur des milieux solides qu'en présence d'autres espèces provenant du même environnement. Cela met en évidence que ces bactéries ont besoin de molécules excrétées par d'autres bactéries pour croître. La **figure 3** expose quelques exemples de ces molécules et leurs effets bénéfiques sur la croissance des bactéries NC. Les nutriments communs fournis par les autres micro-organismes peuvent être des acides aminés, sources de carbone etc. Des enzymes sécrétées par ces mêmes bactéries peuvent protéger les bactéries NC de stress environnementaux comme le peroxyde d'hydrogène. Les sidérophores des bactéries voisines peuvent solubiliser le fer sous forme Fe^{3+} et permettre son incorporation par les bactéries NC (Ramamurthy *et al.*, 2014). Ces recherches représentent actuellement le plus gros déficit dans le domaine de la croissance bactérienne.

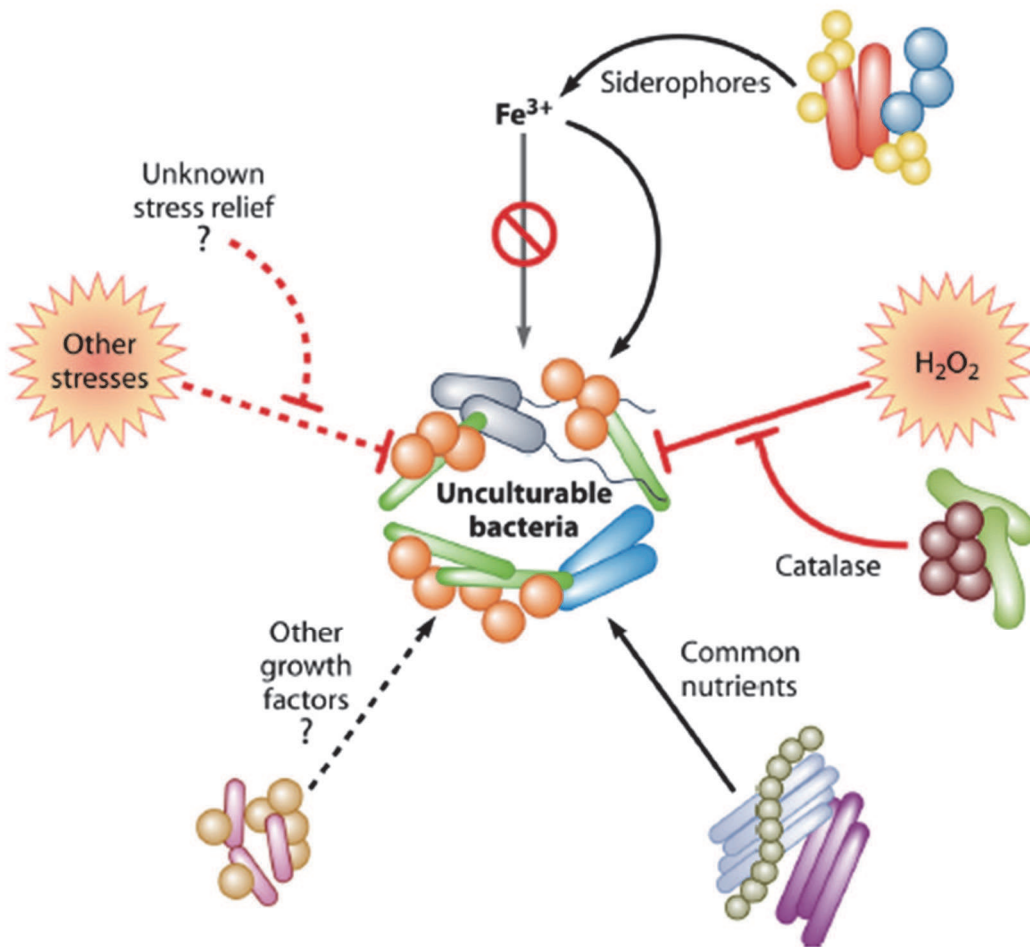


Figure 3 : Interactions avec les bactéries non cultivables lors de co-cultures. Les bactéries non-cultivables sont représentées au centre de la figure. Les flèches indiquent un effet positif et les barres un effet inhibiteur (Ramamurthy *et al.*, 2014).

2) Les bactéries non cultivables suite à un stress environnemental

Si un micro-organisme voit son environnement se modifier brutalement, cela peut entraîner différents stress au niveau cellulaire. Ces stress sont par exemple la variation de température, de pH et d'autres paramètres physiologiques qui seront détaillés dans la partie II de l'étude bibliographique. Si la cellule n'est pas tuée, son métabolisme va s'adapter à ce nouvel environnement. Il existe cependant certains cas où la cellule ne se développera plus dans son nouvel environnement, comme détaillé par la suite.

a. Stade viable mais non cultivable/dormance

Les bactéries viables mais non cultivables (VBNC) et les bactéries en état de dormance sont des bactéries se trouvant dans un état physiologique qui ne leur permet plus de se développer dans un milieu de culture, suite à un stress environnemental. A l'inverse des bactéries NC, ces bactéries VBNC étaient capables de croître sur un milieu de culture classique avant de rentrer dans ces stades physiologiques (Oliver, 2005). La différence entre les bactéries VBNC et les bactéries dans le stade physiologique de dormance a fait l'objet de nombreux débats. Il s'avère cependant que cette différence se situe au niveau de l'activité métabolique; les bactéries VBNC sont métaboliquement actives par rapport aux cellules en dormance où les voies métaboliques fonctionnent à leur strict minimum (Ramamurthy et al., 2014). Ces états physiologiques correspondent à des stratégies permettant de survivre dans des environnements hostiles. Cet état est souvent retrouvé chez les bactéries pathogènes de l'homme, suite à une infection, leur permettant de survivre à l'intérieur de l'hôte. De ce fait, ces pathogènes ne sont pas détectables par les méthodes classiques nécessitant la croissance du micro-organisme.

Lorsqu'une bactérie entre dans ce stade, son métabolisme se modifie : l'expression d'un grand nombre de gènes est fortement réprimée et les facteurs induisant la division cellulaire sont totalement inhibés (Trevors *et al.*, 2012). Cependant, les bactéries VBNC ont la particularité de pouvoir « ressusciter » lorsque l'environnement redevient favorable. Cela peut être dû à des facteurs promoteurs de ressuscitation (Rpf). Le premier à avoir été découvert est une cytokine bactérienne sécrétée par *Micrococcus luteus* (Mukamolova *et al.*, 2002). Cette protéine induit la sortie du stade VBNC chez *M. luteus* mais également chez certaines espèces se trouvant à proximité de cette bactérie. Depuis, d'autres facteurs Rpf sécrétés par différentes espèces ont été identifiés. La plupart auraient la particularité d'hydrolyser le peptidoglycane qui pourrait être un signal d'activation cellulaire (Ramamurthy *et al.*, 2014). L'identification de ces molécules est une perspective intéressante dans le but d'améliorer les méthodes de culture de ces bactéries pouvant se trouver dans ces différents stades physiologiques.

b. Le choc des nutriments

Le choc des nutriments n'est pas considéré comme un stress « habituel » mais plus comme un concept. Un tel stress empêcherait la bactérie de s'adapter à la soudaine augmentation des nutriments dans le milieu. Ce stress serait également différent du choc osmotique car il n'est pas seulement causé par la pression exercée sur la membrane bactérienne (voir partie II). Deux hypothèses seraient envisagées pour expliquer ce concept. Dans la première, les transporteurs seraient saturés et les nutriments ne seraient plus incorporés dans la cellule. Dans la deuxième, les nutriments incorporés ne pourraient pas être tous en même temps métabolisés, induisant un état de dormance cellulaire (Azevedo *et al.*, 2012). Selon cet auteur, même si l'existence du choc des nutriments est acceptée par la communauté scientifique, il n'existe pas de preuves de ce concept dans la littérature. Il a été cependant démontré qu'il était possible de sortir les cellules de l'état de dormance suite au choc des nutriments par la méthode de filtration-acclimatation (Hahn *et al.*, 2004). Cette technique consiste à acclimater les bactéries venant d'un milieu très pauvre en nutriments à un milieu plus riche en augmentant faiblement la concentration des milieux, étape par étape.

c. Phénomènes stochastiques

D'autres phénomènes peuvent illustrer les limites des méthodes de cultures actuelles. Ces phénomènes sont très discutés dans la communauté scientifique et les avis divergent fortement. Il s'agit des phénomènes stochastiques. En effet, ces phénomènes pourraient avoir une influence dans le développement des cellules, c'est-à-dire que l'expression de gènes pourrait se produire de manière aléatoire et non contrôlée (Losick and Desplan, 2008). La mise en place de l'état de compétence de *Bacillus subtilis* constitue un bon exemple : une cellule compétente est capable d'absorber de l'ADN situé à l'extérieur à la cellule. Chez *B. subtilis*, l'état de compétence est transitoire et sa mise en place s'effectue en fin de phase exponentielle. Le passage au stade de compétence nécessite l'expression d'une centaine de gènes, *comK* est le gène codant pour la protéine régulatrice induisant la compétence. Suite à un couplage du promoteur de *comK* à la protéine fluorescente verte (GFP), il a été observé que dans une communauté de cellules de *B. subtilis* présentes dans un même environnement, seulement 20% des bactéries seraient en état de compétence à un moment donné. Le

promoteur de *comK* serait donc régulé de manière aléatoire (Maamar *et al.*, 2007). D'autres études ont tenté de démontrer ces phénomènes. Une publication plus récente explique que les phénomènes stochastiques pourraient jouer un rôle dans la persistance bactérienne (cellules d'une population sensible à un antibiotique devenues résistantes à ce dernier) (Maisonneuve *et al.*, 2013). Ces phénomènes pourraient être induits par de multiples sources dont la variation de l'activité individuelle d'un gène ou les fluctuations d'un signal extérieur (Losick and Desplan, 2008). Si ces phénomènes sont avérés, le développement d'une cellule unitaire dans un milieu donné ne serait alors pas reproductible à 100%. Il ne semble pas dans ce cas exister de solutions pour résoudre ce problème.

Tous ces exemples montrent les difficultés à surmonter afin de cultiver un large panel de micro-organismes. Certaines pistes, comme par exemple l'ajout de molécules stimulant la croissance des bactéries, semblent prometteuses et méritent de s'y attarder. Néanmoins, il semblerait que certaines limites existent que la microbiologie moderne aura du mal à dépasser.

Dans la partie suivante seront présentés les aspects importants du métabolisme bactérien et de nutrition, nécessaires à la formulation d'un milieu de culture synthétique.

II. Le métabolisme bactérien

Le but de ce chapitre est d'acquérir une vision globale du métabolisme bactérien, soulignant les points importants nécessaires à la formulation d'un milieu de culture. Lors de la croissance bactérienne, l'environnement ainsi que les nutriments présents doivent fournir à la cellule trois éléments primordiaux : une source de carbone afin de générer de la biomasse, une source d'énergie fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule et un donneur d'électrons permettant la réduction de la source de carbone. Afin de simplifier les choses, les micro-organismes peuvent se classer par type trophique : si la source de carbone est une molécule organique, l'organisme est **hétérotrophe**. Si le CO₂ (élément inorganique) est la source de carbone, l'organisme est dit **autotrophe**. Il existe deux types de sources d'énergie: la lumière (organisme **phototrophe**) et l'oxydation de composés organiques/inorganiques (organisme **chimiotrophe**). Enfin la source d'électrons peut venir de molécules organiques (organisme **organotrophe**) ou inorganiques (organisme **lithotrophe**). D'autres organismes appelés mixotrophes combinent les métabolismes chimiolithoautotrophes et hétérotrophes ce qui leur permet de s'adapter à des conditions environnementales variables. Notons que chez les organismes chimioorganohétérotrophes, une seule et même molécule peut être la source de carbone, d'énergie et d'électrons. Les micro-organismes de la liste présentés dans l'introduction et retrouvés comme contaminants dans les environnements industriels sont tous chimioorganohétérotrophes. De ce fait la présentation du métabolisme qui va suivre ne portera que sur ce type trophique.

Le métabolisme peut être divisé en deux parties : le **catabolisme** qui inclut les voies métaboliques dégradant les nutriments afin de libérer de l'énergie utilisable par la cellule mais également de synthétiser des métabolites précurseurs ; l'**anabolisme** comprenant les réactions consommant de l'énergie afin de synthétiser de nouvelles molécules et de la matière organique (Weil and Bonnet, 2005). Les réactions anaboliques et cataboliques sont interconnectées et fonctionnent en continu afin de fournir à la cellule les protéines, acides nucléiques, polysaccharides et lipides formant les macromolécules nécessaires au bon fonctionnement cellulaire.

a) *Respiration versus fermentation*

Afin d'appréhender correctement le métabolisme, il est important de définir les notions de respiration et fermentation. Lors de la respiration, les électrons fournis par le donneur d'électrons ainsi que par certaines réactions métaboliques vont alimenter la chaîne de transport des électrons. Cette chaîne permet la circulation des électrons via différents transporteurs qui vont alors expulser des protons hors de la cellule générant ainsi de l'énergie. Les protons expulsés vont être réassimilés dans la cellule au niveau de l'ATP synthase, lui permettant de générer de l'adénosine tri-phosphate (**ATP**) à partir d'adénosine bi-phosphate (ADP). L'ATP est une molécule clé du métabolisme car elle permet de stocker l'énergie (au niveau de la liaison phosphate-phosphate) à l'intérieur de la cellule. L'ATP fournit l'énergie nécessaire à la réalisation des réactions anaboliques. Une fois la chaîne de transport des électrons traversée, les électrons sont couplés à un accepteur terminal d'électrons. Lors de la **respiration aérobie**, cet accepteur final est l'oxygène. Si l'accepteur final d'électron n'est pas l'oxygène, il s'agit de la **respiration anaérobie**.

La principale différence entre la **respiration** et la **fermentation** réside dans le fait que le processus de fermentation ne fait pas appel à la chaîne de transport des électrons. En effet, l'ensemble de l'ATP est produit lors des réactions du catabolisme. Une seconde différence concerne les accepteurs d'électrons qui proviennent de l'extérieur de la cellule dans le cadre de la respiration, alors que ceux-ci proviennent principalement de la cellule même dans le processus de fermentation (le pyruvate étant l'accepteur le plus souvent utilisé). Notons cependant que la fermentation de Stickland utilise des acides aminés provenant de l'extérieur de la cellule comme accepteurs d'électrons. Les acides aminés n'ayant pas le rôle d'accepteur d'électrons sont utilisés comme source d'énergie (oxydation de ces derniers) (Nisman, 1954).

b) *Les principaux cycles du métabolisme central*

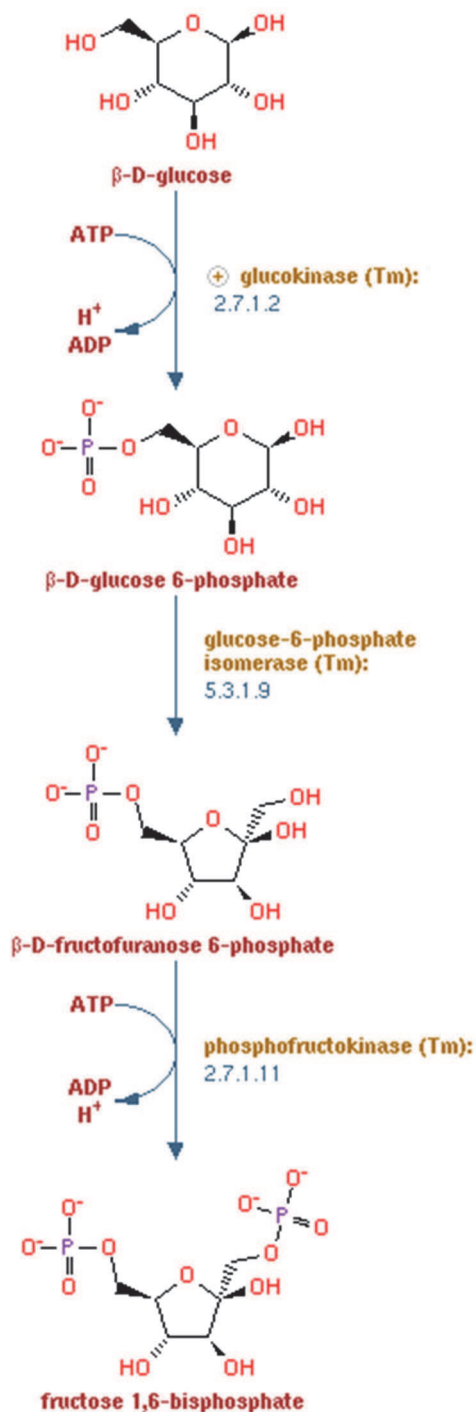
Pour un grand nombre de micro-organismes, les sources de carbone utilisées sont les glucides dont majoritairement le glucose, molécule à six carbones (6C). Il existe de nombreuses autres sources de carbone contenant un nombre différent de carbones que les bactéries peuvent assimiler. Les voies qui vont suivre montrent différentes façons de dégrader le glucose. Cependant la majorité des sources de carbone (après oxydation ou non) pourront être assimilées par l'une ou plusieurs de ces voies. La finalité de la dégradation du glucose est de produire du pyruvate (3C) qui est un **précurseur métabolique**.

Les précurseurs métaboliques sont des molécules situées au carrefour des voies cataboliques et anaboliques. Cela signifie que ces métabolites sont le résultat de la dégradation des nutriments par les voies cataboliques et sont les précurseurs des voies anaboliques servant à former de la matière organique. Il existe 13 précurseurs métaboliques : le glucose-6-P, le fructose-6P, le ribose-6P, le sédoheptulose-7P, l'érythrose-4P, le glyceraldéhyde-3P, le 3-phosphoglycérate, le phosphoénolpyruvate, le pyruvate, l'acétyl-CoA, le 2-oxoglutarate, le succinyl-CoA, et l'oxaloacétate. A partir de ces molécules, toutes les voies anaboliques peuvent être réalisées. Les voies qui vont suivre sont les voies du catabolisme les plus fréquemment retrouvées chez les micro-organismes afin de générer les 13 métabolites précurseurs (Schaechter *et al.*, 2006) (voir également **figure 10**).

1) Les voies cataboliques

De nombreuses voies permettent l'oxydation (perte d'électrons) du glucose selon l'organisme étudié. La plupart du temps, ces voies métaboliques peuvent être réversibles. En effet, les enzymes impliquées permettent qu'une réaction chimique se déroule dans un sens ou dans l'autre. Ainsi, une même voie peut être utilisée dans l'anabolisme mais également dans le catabolisme. Par soucis de clarté, seules les enzymes permettant les voies cataboliques seront présentées.

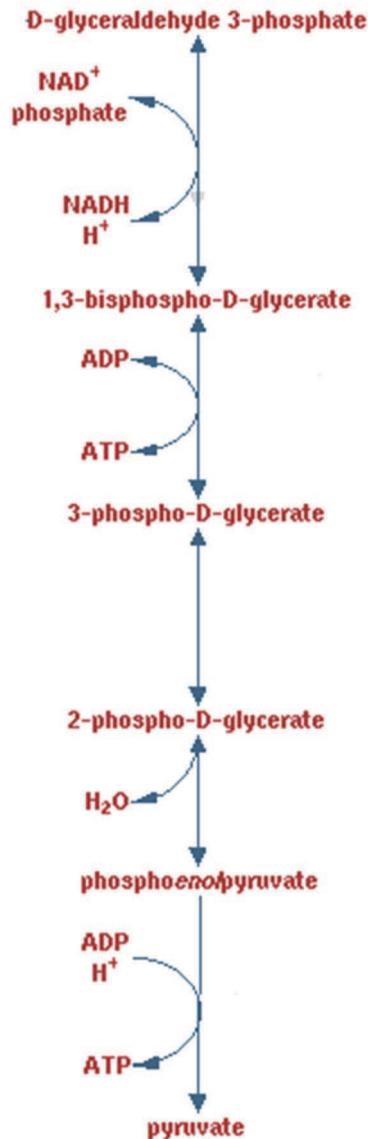
a. La voie d'Embden-Meyerhof



Cette voie communément appelée glycolyse va permettre l'oxydation du glucose en deux molécules de pyruvate. Cette voie est retrouvée dans la majorité des micro-organismes car elle peut être effectuée lors de la respiration aéro/anaérobie ainsi que lors du processus de fermentation. Le glucose va être phosphorylé avec l'aide d'ATP (il y a donc ajout d'une molécule de phosphate) lors de son entrée dans la cellule. A partir de ce moment, la molécule de glucose ne pourra plus sortir de la cellule. Le glucose 6-phosphate, après transformation en fructose 6-phosphate, va être à nouveau phosphorylé formant ainsi du fructose 1,6-bisphosphate. Cette première partie du cycle a nécessité 2 molécules d'ATP (voir **figure 4**).

Figure 4 : Première partie des réactions du cycle d'Embden-Meyerhof. Une molécule de glucose est métabolisée en fructose 1,6-bisphosphate (<http://metacyc.org/>).

La deuxième partie du cycle consiste à cliver le fructose 1,6-bisphosphate (6C) en deux molécules de glycéraldéhyde 3-phosphate (3C). Cette molécule composée de 3 atomes de



carbone va être à la fois oxydée et phosphorylée, c'est-à-dire qu'un atome d'hydrogène va être séparé d'un des atomes de carbone pour y être remplacé par un phosphate formant du 1,3-bisphospho-D-glycerate. C'est le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD, coenzyme transporteur d'électrons) qui sert à l'oxydation de la molécule de glycéraldéhyde. Notons que le 1,3-bisphospho-D-glycerate possède deux phosphates, faisant de lui une molécule « riche en énergie ». De ce fait, un des phosphates va être transféré sur une molécule d'ADP produisant ainsi de l'ATP et une molécule de 3-phosphoglycérate (métabolite précurseur). Le phosphate de cette dernière va être déplacé sur le carbone central de la molécule puis l'ensemble va être métabolisé en phosphoenolpyruvate, également un métabolite précurseur. Ce dernier va également céder son phosphate à de l'ADP pour former de l'ATP ainsi qu'une molécule de pyruvate, autre métabolite précurseur que joue un rôle clef dans le métabolisme central (voir **figure 5**).

Figure 5 : Deuxième partie des réactions du cycle d'Embden-Meyerhof. Du glycéraldéhyde 3-phosphate est métabolisé en pyruvate. La chaîne de réactions génère deux molécules d'ATP (<http://metacyc.org/>).

Finalement, la voie d'Embden-Meyerhof aura permis à partir d'une molécule de glucose, la formation de deux molécules de pyruvate ainsi que la génération de quatre molécules d'ATP pour deux utilisées. Dans le cadre de la respiration, les NADH produits lors des réactions chimiques vont également permettre d'alimenter le système de transporteurs d'électrons, générant ainsi 6 ATP supplémentaires (non visible sur les figures) (pour revue voir (Weil and Bonnet, 2005; Willey *et al.*, 2011)). De ce fait, cette voie joue un rôle primordial dans le métabolisme bactérien. En effet, elle permet l'assimilation de carbone sous forme de sucre mais également la production de l'énergie pour la cellule ainsi que les métabolites précurseurs permettant d'alimenter les voies anaboliques.

b. La voie des pentoses phosphates

Le cycle des pentoses phosphates utilise aussi comme point de départ le glucose et va également produire du Glycéraldéhyde-3-P. Cependant, le glucose va être métabolisé en une molécule à 5 carbones, Le Ribulose-5-P. Lors de cette oxydation, du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP) va recevoir un électron supplémentaire (NADPH). Le NADP est également un transporteur d'électrons comme le NAD mais le plus souvent utilisé pour les réactions de biosynthèses. Cette voie est la principale productrice de NADPH. Le Ribulose-5-P peut être soit converti en Ribose-5-P, soit en Xylulose-5-P. Pour simplifier la compréhension du cycle, ces sucres vont soit se transformer en hexoses afin de réalimenter le cycle, soit être métabolisés en métabolites précurseurs que sont le fructose-6-P ou l'érythrose-4-P ou être métabolisés en Glycéraldéhyde-3-P afin d'alimenter la voie d'Embden-Meyerhof pour produire du pyruvate (pour revue voir (Horecker, 2002; Kruger and Von Schaewen, 2003; Patra and Hay, 2014)) (voir **figure 6**).

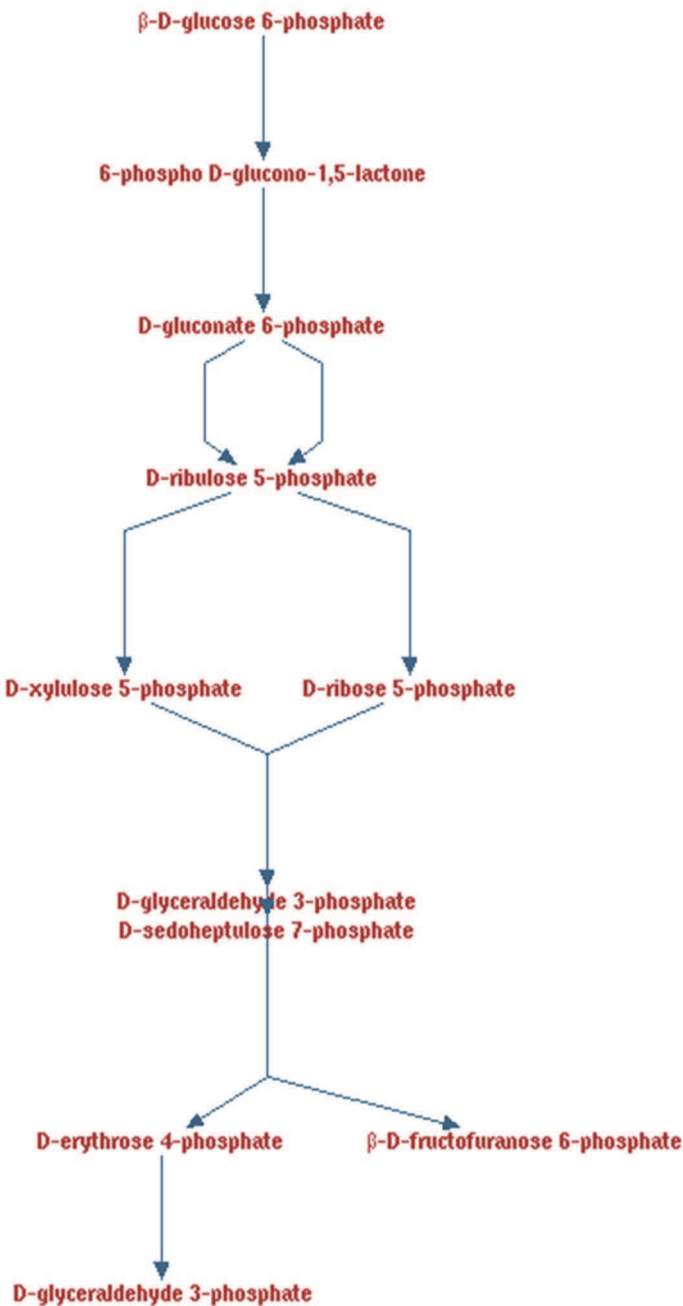


Figure 6 : Voie des pentoses phosphates. Le glucose 6-P peut être oxydé en différents substrats comme le fructose 6-P, l'érythrose-4-P ou le glycéraldéhyde 3-P. La figure ne représente pas la conversion du fructofuranose 6-P en glucose 6-P (<http://metacyc.org/>).

c. La voie d'Entner-Doudorof

La voie d'Entner-Doudorof est la troisième voie la plus utilisée par les micro-organismes permettant l'assimilation des sucres. Elle a été découverte chez *Pseudomonas saccharophila* en 1952 puis quelques années après chez *Escherichia coli* (Peekhaus and Conway, 1998). Cette voie permet d'assimiler le glucose et le métaboliser en gluconate 6-P. La différence avec la voie des pentoses phosphate est que le gluconate 6-P est métabolisé en 2-déhydro-3-deoxy-D-gluconate 6-phosphate. Cette molécule va être clivée en pyruvate et en glycéraldéhyde 3-P (voir **figure 7**). Notons que cette partie ne fournit pas d'ATP. Seule la dégradation de la molécule de glycéraldéhyde 3-P en fournira (Fabris et al., 2012).

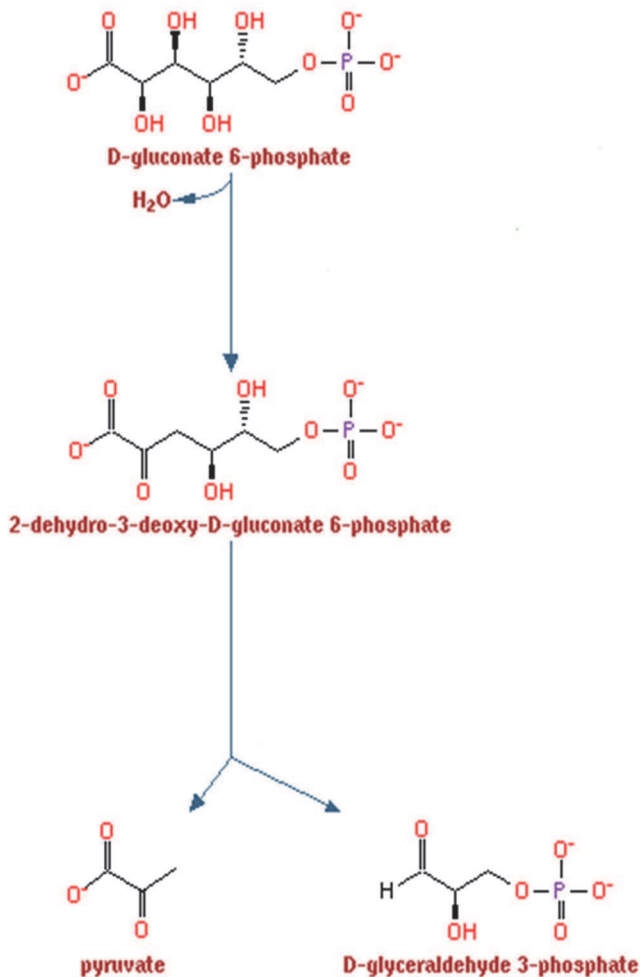


Figure 7: Voie d'Entner-Doudorof. Le glucose 6-P (non représenté sur la figure) est métabolisé en 2-déhydro-3-deoxy-D-gluconate 6-phosphate donnant par la suite du pyruvate et glycéraldéhyde 3-P. (<http://metacyc.org/>).

Nous venons de voir les principales voies de dégradation du glucose (réactions cataboliques) permettant l'obtention de molécules de pyruvate. Cette molécule détient un rôle important dans le métabolisme car il peut être métabolisé en acétyl CoA comme le montre la **figure 8**. L'acétyl CoA est un acétyl (COCH₃) relié au coenzyme A. Cette coenzyme est une molécule complexe, constituée notamment de vitamine B5, et possède à l'une de ses extrémités un groupement thiol (-SH). Cette coenzyme est très utilisée par les réactions du catabolisme. En

effet, la liaison entre l'acétyl et le groupement thiol est riche en énergie ce qui va permettre à l'acétyl CoA d'intégrer le cycle des acides tricarboxyliques.

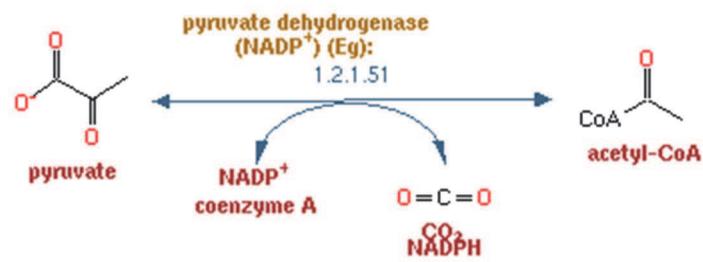


Figure 8 : Décarboxylation du pyruvate puis addition d'une coenzyme A formant une molécule d'acétyl-CoA. La réaction va produire une molécule de CO₂ ainsi qu'un NADPH. (<http://metacyc.org/>).

d. Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA)

Le cycle des acides tricarboxyliques également appelé cycle de l'acide citrique voire cycle de Krebs, a été mis en évidence par Hans Adolf Krebs en 1937 (Krebs and Johnson, 1937; Krebs et al., 1938). Ce cycle est capital dans les étapes de la respiration car il va permettre la génération de plusieurs précurseurs métaboliques, permettant notamment la formation de nombreux acides aminés, ainsi qu'une quantité importante d'énergie disponible pour la cellule. Ce cycle peut aboutir à la dégradation totale du pyruvate en molécules de CO₂. De ce fait, on constate que le glucose peut être totalement oxydé par le métabolisme central, combinaison d'une ou des voies glycolytiques et du cycle TCA. Cependant, notons que l'acétyl CoA entrant dans le cycle TCA ne provient pas obligatoirement de la glycolyse. Ce cycle est donc la finalisation de nombreuses voies cataboliques, que ce soit par l'utilisation de l'acétyl CoA ou par incorporation d'autres molécules ayant rôle d'intermédiaires du cycle (voir **figure 9**).

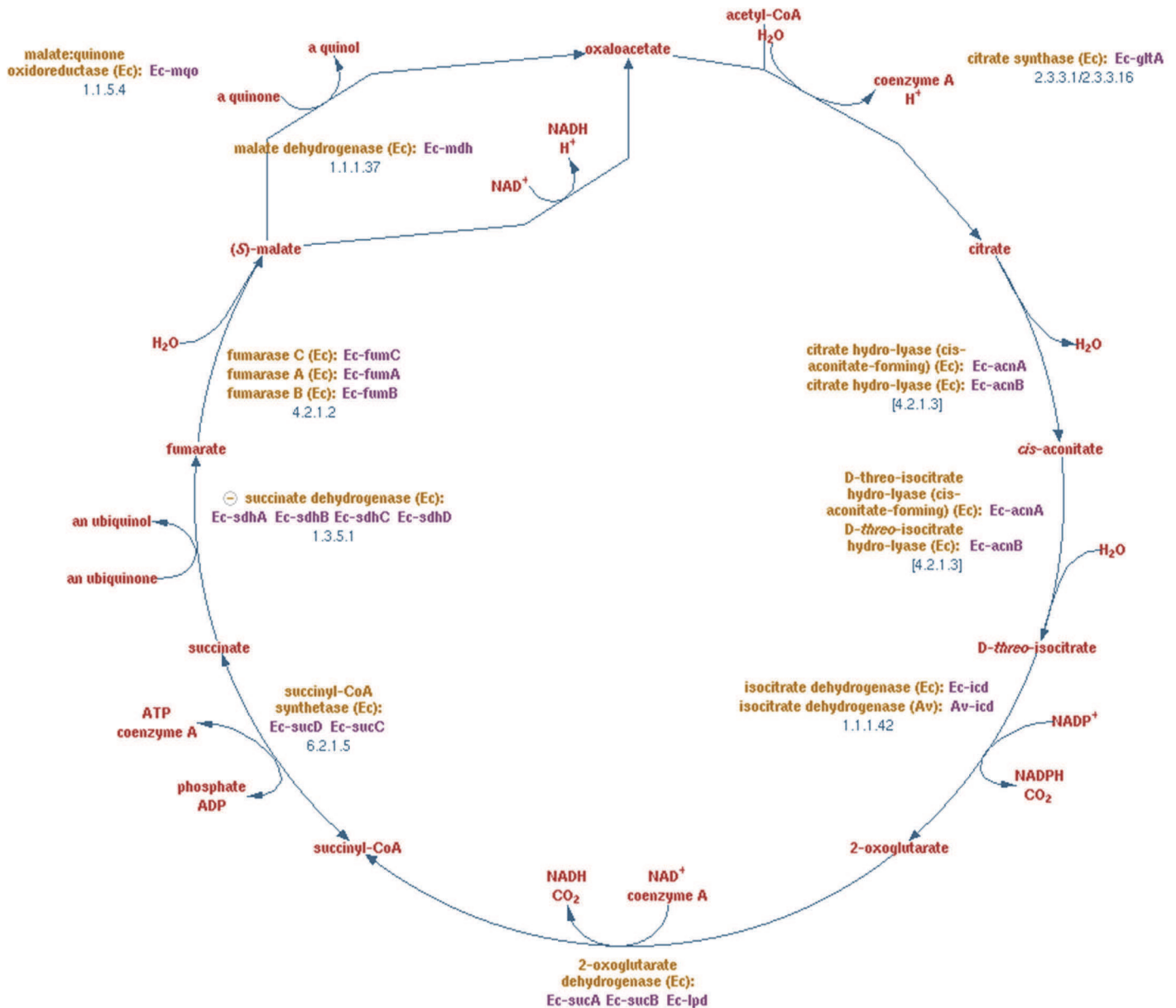


Figure 9 : Cycle des acides tricarboxyliques chez les procaryotes. L'acétyl CoA va être métabolisé en oxaloacétate, générant du NADPH et de l'ATP. Il s'agit du cycle produisant le plus d'énergie dans le métabolisme central chez les organismes l'utilisant (<http://metacyc.org/>).

L'Acétyl CoA entrant dans le cycle TCA va être scindé en deux au niveau de la fonction thiol de la coenzyme A. L'énergie libérée va permettre l'incorporation de l'acétyl à une molécule d'oxaloacétate (métabolite précurseur, 4C) formant une molécule de citrate (6C). Une série de réactions va aboutir à une molécule d'oxoglutarate (ou α -cétoglutarate, également métabolite précurseur) à 5 carbones. De ce fait, une molécule de CO_2 est générée. L'oxoglutarate va être métabolisé en une molécule à 4 carbones, le succinyl CoA. Une molécule de CO_2 est alors générée et une molécule de coenzyme A a été ajoutée. La fin du

cycle va permettre de revenir à une molécule d'oxaloacétate avec génération d'ATP et de NADH. Les molécules de NADH et NADPH formés vont générer de nouvelles molécules d'ATP via la chaîne de transport des électrons. De ce fait, ce cycle peut former jusqu'à 12 ATP par tour de cycle (Gest, 1981; Meléndez-Hevia *et al.*, 1996). Ce cycle TCA est représenté de manière circulaire dans de nombreux ouvrages, mais également dans beaucoup de manuels de microbiologie. Cependant, il s'agit la plupart du temps du cycle TCA retrouvé chez les animaux qui ont une demande énergétique extrêmement importante. Pour un organisme unicellulaire, procaryote ou eucaryote (levure), l'objectif principal est la division cellulaire. De ce fait, la cellule va métaboliser le maximum de métabolites précurseurs afin de synthétiser de la biomasse. Il y a donc moins d'intérêt pour un organisme unicellulaire à utiliser de manière complète le cycle TCA, c'est-à-dire oxyder de manière complète les sources de carbone.

2) Les réactions anaboliques

Nous venons d'étudier les principales voies cataboliques fournissant à la fois les molécules et l'énergie nécessaires à la génération de nouvelles molécules et de biomasse. Les réactions anaboliques vont utiliser l'énergie cellulaire disponible (le plus souvent sous forme d'ATP) afin de synthétiser les molécules nécessaires au développement et à la multiplication de la cellule comme des acides aminés, les acides gras et les acides nucléiques (détail dans la partie suivante). Les métabolites précurseurs produits lors des réactions glycoliques et du cycle TCA vont être à l'origine de la fabrication de ces molécules essentielles. La **figure 10** montre de manière schématique leur imbrication dans le métabolisme central ainsi que les différentes voies anaboliques permettant la synthèse de macromolécules dont ils sont les précurseurs. Notons l'importance du pyruvate et de l'oxaloacétate qui à eux deux permettent la synthèse de 9 acides aminés. Il existe des représentations du métabolisme central indiquant l'ensemble des voies cataboliques et anaboliques ainsi que leurs interconnexions (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/meTableauolomics/learning-center/meTableauolic-pathways.html>;<http://biochemical-pathways.com/#/map/1>). Ces représentations donnent une idée de la complexité de l'ensemble des voies du métabolisme mais elles restent difficiles à interpréter et mélangent parfois le métabolisme procaryote et eucaryote.

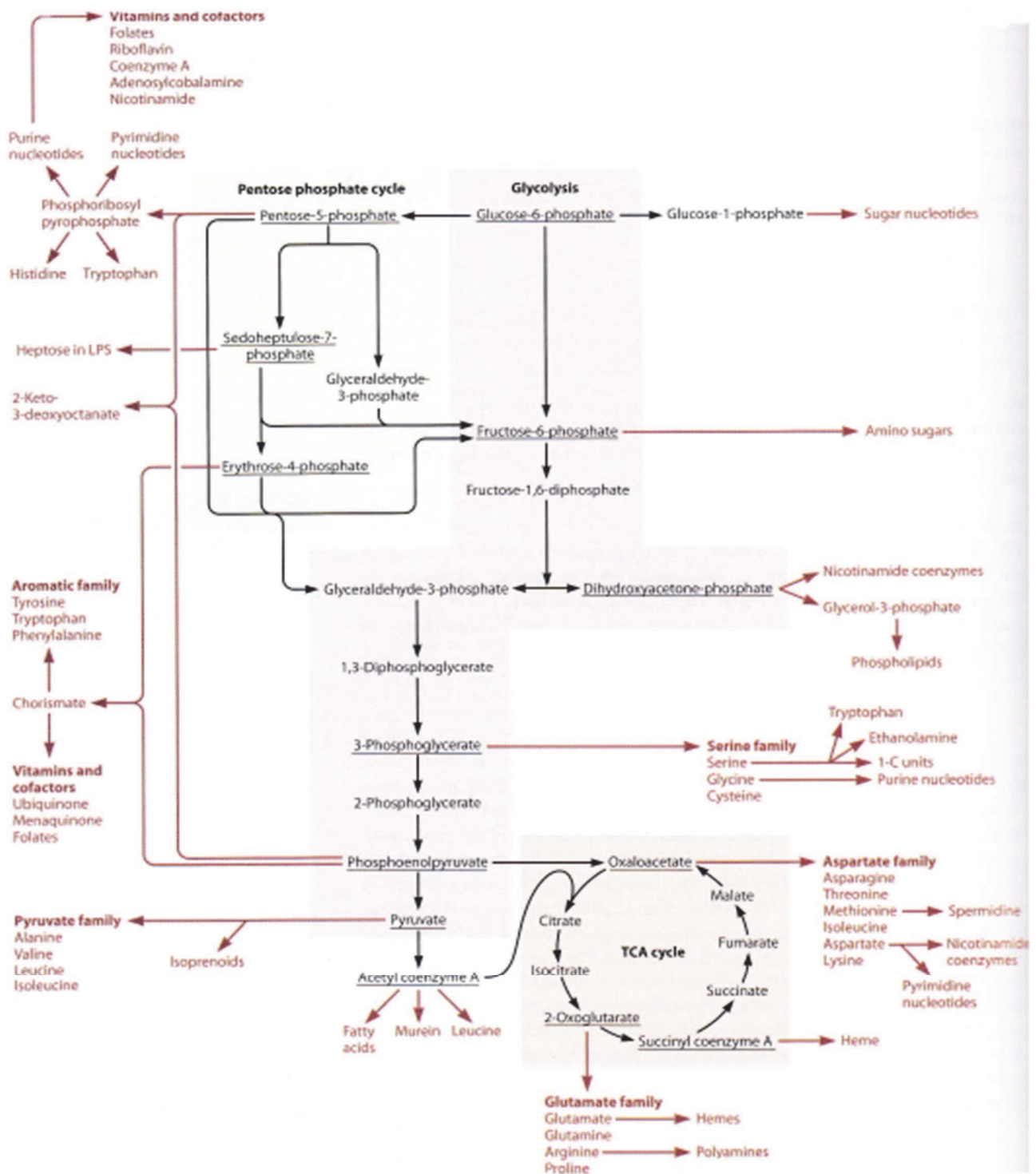


Figure 10 : Représentation du métabolisme central bactérien. Les métabolites précurseurs à l'origine des voies anaboliques sont soulignés en noir. (Schaechter *et al.*, 2006)

La partie III présente des métabolismes utilisant des sources de carbone différentes du glucose. Les voies d'assimilation sont de ce fait différentes mais les principes du catabolisme (assimiler de l'énergie et générer des métabolites précurseurs) et de l'anabolisme (générer de la biomasse) restent les mêmes.

c) *La nutrition*

La nutrition correspond à l'assimilation et l'utilisation des **nutriments** par les micro-organismes. En effet, après assimilation (et souvent dégradation) des nutriments par la cellule bactérienne, cette dernière va synthétiser des **macromolécules** par les voies anaboliques. Les macromolécules correspondent aux protéines, acides nucléiques, polysaccharides (sucres) et lipides. Les nutriments doivent être présents dans l'environnement ou le milieu de culture dans lequel se trouve le micro-organisme. Les nutriments peuvent être répertoriés selon différentes classes que nous allons détaillées.

1) Les macronutriments

Les macronutriments sont les nutriments les plus utilisés par les cellules bactériennes et sont pour la plupart indispensables. Ils sont la base de la constitution des macromolécules. Le carbone est le macronutriment le plus abondant d'une cellule bactérienne. Ce dernier constitue l'élément de base de toutes les macromolécules de la cellule. Il est généralement assimilé sous forme de sucre dont le plus courant est le glucose, mais il peut être également assimilé sous forme d'une très large gamme de molécules dont les acides aminés et les acides gras (polymères de longues chaînes de molécules de carbone) voir même sous forme de CO₂. L'azote est le deuxième macronutriment le plus important. Ce dernier est présent dans de nombreuses molécules et a la particularité d'être assimilable à l'état organique (acides aminés ou nucléotides) ou à l'état inorganique comme les sels d'ammonium (NH₄), les nitrates (NO₃⁻) voir sous forme d'azote gazeux (N₂). Certains macronutriments ne sont pas indispensables pour toutes les bactéries comme le calcium ou le sodium par exemple. En effet, certaines bactéries ne peuvent se développer qu'en présence d'une grande quantité de sel (halophiles) alors que d'autres n'en n'auront pas besoin. Les autres macronutriments sont détaillés dans

le **tableau 2**. Dans les milieux de culture, ces éléments sont rajoutés sous forme de sels afin de compléter ceux présents dans les extraits de levure par exemple.

Macroélément	Fonction(s)
Carbone	squelette carboné des macromolécules
Azote	constituant des acides nucléiques et aminés
Potassium	constituant enzymatique
Sodium	maintien de la pression osmotique
Magnésium	cofacteur enzymatique, stabilise les ribosomes et paroi cellulaire
Calcium	maintient la paroi cellulaire
Soufre	constituant de vitamines et acides aminés, protéines à noyau fer-soufre
Oxygène	accepteur d'électrons, constituant des molécules
Phosphore	constituant des phospholipides et acides nucléiques

Tableau 2 : Macroéléments nécessaires à la croissance bactérienne. Ces neuf atomes sont retrouvés en grandes quantités dans la cellule bactérienne (Madigan, 2005).

2) Les acides aminés

Les acides aminés également appelés aminoacides ont un rôle capital dans le métabolisme car ils sont les constituants des protéines. Les protéines ont de multiples fonctions au sein d'une cellule : les enzymes sont des protéines catalysant les réactions chimiques; les protéines structurales sont utilisées dans l'architecture de la cellule; les protéines de transport servent à transporter des molécules de part et d'autre de la membrane bactérienne ; les protéines de régulation ou de signalisation ont également des rôles indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Toutes les protéines sont une succession d'acides aminés contenant ou non un groupement prosthétique (qui n'est pas composé d'acides aminés). Il existe 20 acides aminés que l'on retrouve dans la constitution des protéines ainsi que d'autres non retrouvés dans les protéines mais pouvant avoir un rôle métabolique. Les acides aminés constituant les protéines sont toujours sous la forme L. Les aminoacides retrouvés sous la forme D sont rares et sont présents au niveau de la membrane cellulaire.

Si les acides aminés ne sont pas fournis par l'environnement, ces derniers sont synthétisés à partir de métabolites précurseurs (voir **figure 11**). Cependant certains micro-organismes ne possèdent pas (naturellement ou par mutation) d'enzymes permettant la synthèse d'un ou plusieurs acides aminés. Ces micro-organismes sont dits auxotrophes aux acides aminés qu'ils ne peuvent pas synthétiser. Dans ce cas, l'organisme doit trouver l'acide aminé non synthétisable dans sa nutrition pour pouvoir se développer. Pour certains organismes, les acides aminés peuvent également être assimilés comme source de carbone. Dans les milieux biologiques, les acides aminés sont fournis sous formes de peptides provenant de l'extrait de levure ou des peptones.

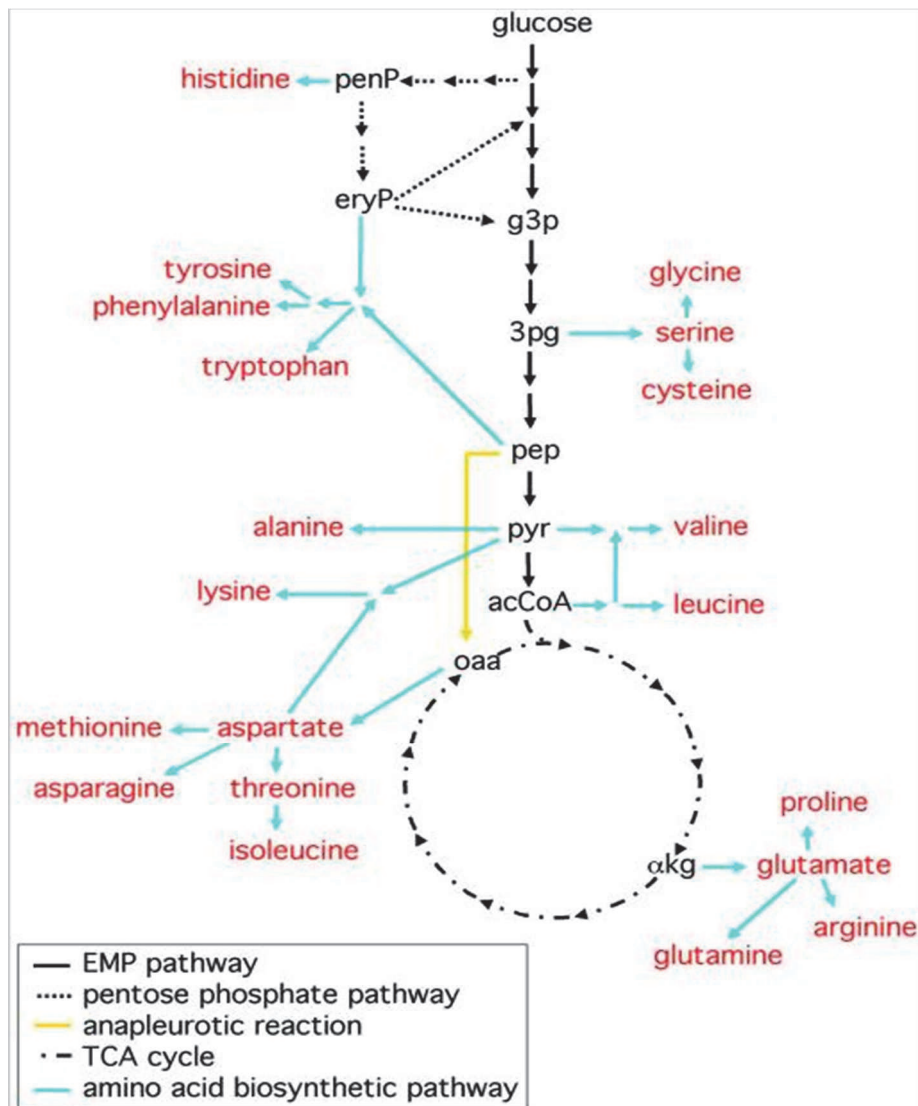


Figure 11 : Représentation des métabolites précurseurs à l'origine d'acides aminés chez *Escherichia coli*. PenP : ribose 5-phosphate; eryP : érythrose-4-P; 3pg : 3-phosphoglycérate; pep : phosphoénolpyruvate; pyr : pyruvate; acCoa : acétyl CoA ; oaa : oxaloacétate; αkg : α-cétoglutarate. (Akashi and Gojobori, 2002).

3) Les bases azotées

Il existe deux types d'acides nucléiques : l'acide désoxyribonucléique (ADN) portant l'information génétique et l'acide ribonucléique (ARN) permettant de transcrire l'information génétique en protéine. Les acides nucléiques sont une succession de nucléotides, différents selon qu'il s'agisse d'ADN (ATGC) ou d'ARN (AUGC). Les nucléotides sont eux même composés de trois structures différentes : une base azotée, un pentose (sucre à 5C, désoxyribose pour l'ADN, ribose pour l'ARN) et un acide phosphorique. Si le phosphate n'est pas présent, on parle alors de nucléoside. La cytosine, la thymine et l'uracile sont des bases pyrimidiques, elles sont composées d'un « hétérocycle » de six sommets composé de quatre molécules de carbone et deux molécules d'azote (voir **figure 12**). La cytosine constitue l'ADN et l'ARN alors que la thymine n'est présente que dans l'ADN. Inversement, l'uracile compose exclusivement l'ARN. L'adénine et la guanine sont des bases puriques, cela signifie qu'elles ne sont pas composées d'un mais de deux hétérocycles, le deuxième ayant trois sommets dont deux contenant de l'azote (cycle imidazole) comme le montre la **figure 13**. Ces deux bases puriques sont retrouvées à la fois dans l'ADN et l'ARN.

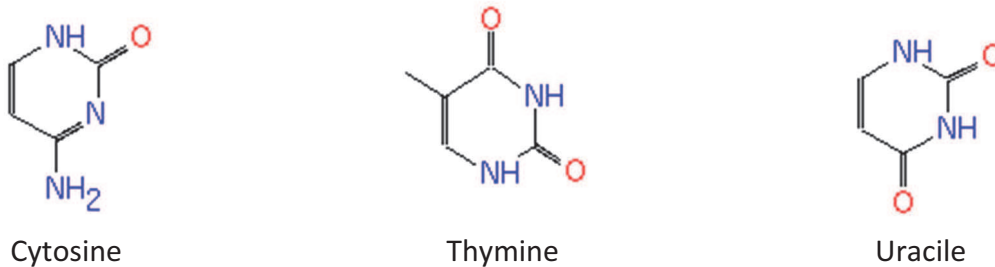


Figure 12 : Bases pyrimidiques. La cytosine est présente dans l'ADN et l'ARN, la thymine dans l'ADN et l'uracile dans l'ARN (<http://metacyc.org/>).

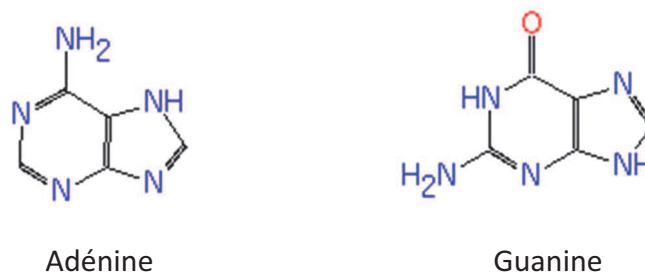


Figure 13 : Bases puriques. L'adénine et la guanine constituent l'ADN ainsi que l'ARN et sont composées d'un hétérocycle lié à un cycle imidazole.

Il existe d'autres bases azotées que l'on retrouve parfois dans des ARN particuliers comme l'hypoxanthine ou la dihydro-uracile. Les nucléotides peuvent être également utilisés par la cellule comme source d'énergie comme l'ATP ou le NAD par exemple. Les micro-organismes possèdent toutes les voies permettant de générer les nucléotides (hors mutations) notamment à partir du ribose-5-P. Cependant ces voies de biosynthèses coûtent en énergie et les micro-organismes assimileront préférentiellement ces nutriments plutôt que les synthétiser. Il y a donc tout intérêt à fournir dans le milieu de culture des bases azotées, plus facilement assimilables et plus solubles que les nucléotides.

4) Les oligo-éléments (micronutriments)

Les oligo-éléments appartiennent à la classe des métaux dans le Tableau périodique. Ils sont également dénommés micronutriments car ils sont nécessaires à la cellule en très petites quantités, sous peine de devenir toxiques. La plupart d'entre eux ont un rôle de cofacteur enzymatique, c'est-à-dire qu'ils vont se coupler à une enzyme afin de la rendre fonctionnelle. Ils stabilisent l'enzyme notamment autour de son site actif et aident à la catalyse lors du transfert d'électrons. Ils sont également connus pour avoir des rôles importants dans la synthèse des acides nucléiques (Sigel and Pyle, 2006). Le **tableau 3** répertorie les fonctions des oligoéléments les plus utilisés par les bactéries :

Oligo-élément	Fonction(s)
Fer	constituant des cytochromes, catalases, protéines fer-soufre
Zinc	ADN et ARN polymérase, Protéines liant l'ADN, alcool déshydrogénase
Cobalt	constituant de la vitamine B12
Manganèse	cofacteur de nombreuses enzymes
Cuivre	cytochrome C oxydase, cofacteur lors de la respiration
Molybdène	nitrogénases, nitrates réductases et sulfites oxydases
Nickel	uréases et la majorité des hydrogénases
Tungstène	Certains formiates déshydrogénases

Tableau 3 : Fonctions des principaux oligo-éléments. Les oligo-éléments ont le plus souvent le rôle de cofacteur enzymatique.

Le fer doit être fourni en quantité importante car il est utilisé dans le processus de respiration. Le fer, sous forme minérale, peut être présent sous deux états d'oxydation : Fe^{2+} (fer ferreux) qui est soluble et Fe^{3+} (fer ferrique). Le fer est utilisable par les bactéries sous forme Fe^{2+} dans le rôle de cofacteur. Cependant, certaines bactéries peuvent respirer du Fe^{3+} , c'est-à-dire l'utiliser comme accepteur final d'électrons. Le fer est difficilement biodisponible dans la nature. De nombreuses bactéries sécrètent des sidérophores afin de capturer le fer ferrique et l'incorporer dans la cellule. Lors de la préparation de milieux de culture, la verrerie utilisée ainsi que les contaminants des composés de base des milieux de cultures (sels minéraux, extraits de levure, etc..) peuvent suffire à fournir les très faibles quantités d'oligo-éléments nécessaires (Prescott, 2003 page 96).

5) Importance des vitamines

Il existe d'autres molécules nécessaires en faible quantité à la croissance bactérienne. Il s'agit des vitamines. Les vitamines sont des molécules complexes assez différentes structurellement les unes des autres comportant au minimum un cycle aromatique et une chaîne carbonée. Il existe deux types de classifications pour ces dernières : soit par leurs solubilités, soit par leurs fonctions. Pour le classement de la solubilité, il n'existe que deux catégories, les vitamines hydrosolubles et les vitamines liposolubles. Pour le classement par fonction, ce dernier est basé sur l'effet des vitamines chez les bactéries mais également chez les humains. De ce fait, toutes les vitamines (A, B, C, D, E et K) ne sont pas nécessaires chez les micro-organismes. En effet, les vitamines A et D ne semblent pas avoir d'effets bénéfiques pour la croissance bactérienne et peuvent être toxiques pour certaines bactéries (Greenstein *et al.*, 2012). A l'inverse, les vitamines C et E ont des propriétés antioxydantes, piégeant les espèces réactives de l'oxygène, la vitamine K sert de transporteur d'électron et la vitamine B est un cofacteur enzymatique. Par exemple, la vitamine B12 intervient dans la biosynthèse de la méthionine, permettant la métabolisation de la L-homocystéine en L-méthionine (Davis and Mingioli, 1950).

Les bactéries peuvent synthétiser un grand nombre de ces vitamines. Par exemple, *Escherichia coli* ainsi que *Methylobacterium extorquens* sont capables de synthétiser toutes les vitamines dont elles ont besoin. Il n'est donc pas nécessaire de leur en fournir pour leur croissance. Si les bactéries sont auxotrophes à une ou plusieurs vitamines, elles disposent de transporteurs

spécifiques pour leur incorporation (Rodionov *et al.*, 2009). Ces transporteurs peuvent être également présents même si la bactérie synthétise les vitamines en question afin d'économiser de l'énergie en les incorporant plutôt que les synthétiser. De plus, certaines vitamines peuvent améliorer la croissance bactérienne. En effet, Ferguson et Cummins ont montré que *Propionibacterium acnes* pouvait se développer sans la présence de thiamine dans le milieu de culture mais son ajout favorisait la croissance de la bactérie (Ferguson and Cummins, 1978). La fragilité des vitamines est un facteur important à prendre en compte lors de leur utilisation. Nombre d'entre elles sont sensibles à la chaleur. Il est donc déconseillé d'autoclaver une solution de vitamines sous peine de dénaturer la structure de ces dernières.

Pour un organisme chimioorganohétérotrophe, la composition la plus simple d'un milieu synthétique doit fournir une source de carbone, d'électrons, d'énergie (pour la majorité du panel, il s'agit du glucose), des macros et micronutriments ainsi que les molécules pour lesquelles il pourrait être auxotrophe. Cependant, si le milieu fournit à l'organisme des molécules comme des acides aminés ou des vitamines, l'organisme les assimilera et **les voies de synthèse de ces molécules ne seront pas activées** afin de ne pas dépenser de l'énergie supplémentaire. De ce fait, si le milieu doit permettre la croissance la plus optimale des micro-organismes, le milieu doit fournir un maximum de molécules évitant la synthèse de ces derniers. La difficulté réside dans le fait que la concentration de ces molécules ne doit pas être trop élevée pour éviter un effet toxique ou la modification de la pression osmotique du milieu (voir page 37).

d) *Paramètres physico-chimiques*

Pour qu'un milieu de culture permette une croissance efficace d'un ou plusieurs micro-organismes, il ne doit pas seulement fournir les bons nutriments en bonnes quantités, mais également permettre d'obtenir les paramètres physico-chimiques adéquats.

1) La température

La température en est un bon exemple de l'influence des paramètres physico-chimiques. Cette dernière permet le bon déroulement des processus cellulaires comme notamment le fonctionnement des enzymes. En effet, la température joue un rôle direct sur la conformation des protéines. Si la température est trop basse, la conformation des enzymes sera modifiée et les réactions chimiques ne se dérouleront plus. A l'inverse, si la température est trop élevée, la dénaturation des protéines interviendra au-delà d'une température seuil, dépendant de la protéine et de l'organisme.

2) Influence du pH

Le potentiel hydrogène, couramment dénommé sous le nom de pH, permet de mesurer l'activité chimique des protons (ions hydrogènes (H^+)) présents dans une solution. Cette activité peut être mesurée par la formule chimique suivante : $pH = -\log [H^+]$ ou $[H^+]$ correspond à la concentration molaire en protons. Les micro-organismes n'ont pas les mêmes tolérances par rapport au pH. En effet le pH extérieur de la cellule peut être différent du pH cytoplasmique, sans dépasser un seuil qui pourrait déstructurer la paroi bactérienne. Les bactéries peuvent être classées en fonction de cette tolérance. Les bactéries acidophiles vont pouvoir se développer de manière optimale dans un environnement dont le pH peut varier de 0 à 5,5, les bactéries neutrophiles dans un pH compris entre 6 et 8 et les acidophiles entre 8 et 11 (Willey *et al.*, 2011).

Le pH d'un milieu n'est jamais fixe et peut évoluer en fonction de l'altération du milieu notamment due aux variations de température (Booth, 1985). Si le milieu contient des micro-organismes, ces derniers vont générer des déchets dus à leur métabolisme (dégradation non totale d'un élément) et vont les rejeter dans le milieu, acidifiant ou basifiant ce dernier selon la nature de ces déchets (Kashket, 1987). Afin de stabiliser les variations de pH d'un milieu, il est nécessaire d'y ajouter une solution tampon afin de capter les protons. La formulation des tampons varie selon le pH que l'on souhaite maintenir. Pour un pH neutre, le tampon phosphate est le plus couramment utilisé.

3) Oxygénation

L'oxygénation du milieu est également un paramètre physico-chimique incontournable. Ce paramètre permet la différenciation de deux types de milieux :

a. Les milieux aérobies

Comme vu précédemment, l'oxygène est l'accepteur final d'électrons chez les micro-organismes respirant le dioxygène, ces derniers étant des organismes aérobies obligatoires. Ceux qui n'ont pas la nécessité de respirer l'oxygène mais peuvent se développer en sa présence sont qualifiés d'aérotolérants. La quantité d'oxygène a également son importance car elle doit être renouvelée. Cependant, la quantité de dioxygène présente dans une boîte de Petri ou dans une bouteille contenant du milieu de culture est largement suffisante pour permettre la croissance bactérienne. Si le dioxygène n'est pas assimilé et utilisé par les bactéries, ce dernier peut se transformer en molécules toxiques comme le peroxyde d'hydrogène. Ces dérivés du dioxygène sont très réactifs et peuvent facilement interagir et dégrader les molécules cellulaires. Les bactéries doivent posséder des enzymes comme la catalase ou la superoxyde dismutase neutralisant ces formes toxiques du dioxygène. Les micro-organismes ne possédant pas ces enzymes et ne respirant pas le dioxygène sont tués par ces formes toxiques. De ce fait, ils ne peuvent se développer qu'en absence d'oxygène.

seront plus disponibles pour les micro-organismes. La majorité des bactéries peuvent se développer dans un milieu ayant un a_w compris entre 1 et 0,90. Les champignons ont la capacité de se développer avec une activité de l'eau plus faible comprise entre 0,85 et 0,70. L'exemple de la confiture met en évidence ce phénomène. La confiture étant très sucrée, l'eau est peu bio-disponible. Il y a donc peu de risque que des bactéries s'y développent. Cependant, il est fréquent d'y observer des moisissures pousser à la surface. Des exemples d' a_w sont présenté **figure 15**.

L'**osmose** est un phénomène par lequel l'eau d'une solution peu concentrée en solutés (ayant l' a_w la plus forte) va migrer vers une solution aqueuse plus concentrée en solutés (ayant l' a_w la plus faible). La **pression osmotique** est la pression nécessaire à exercer sur une membrane semi-perméable (ne laissant passer que l'eau) afin d'empêcher le passage de l'eau de la solution à l' a_w la plus forte vers la solution l' a_w la plus faible. De ce fait, la pression osmotique est inversement proportionnelle à l'activité de l'eau. Plus l' a_w d'une solution est faible, plus la pression osmotique sera forte. La membrane des bactéries peut être vue comme une membrane semi-perméable régulant le passage des composés extérieurs et retenant les composants cytoplasmiques. La membrane doit en permanence réguler la pression osmotique afin de garder l'intégrité de sa cellule. Un milieu hypertonique est un milieu dont la

concentration en solutés est supérieure à la concentration de solutés dans le cytoplasme. On parle alors de choc hyper-osmotique. Dans ce cas, la pression osmotique va favoriser la fuite de l'eau cytoplasmique. A l'inverse, un milieu hypotonique (concentration en solutés plus faible à l'extérieur de la cellule) favorise l'entrée d'eau dans la cellule bactérienne (choc hypo-osmotique) (Sleator and Hill, 2002).

Organism	Minimum water activity* for growth in NaCl
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.970
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.950
<i>Escherichia coli</i>	0.950
<i>Salmonella oranienburg</i>	0.950
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.945
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.945
<i>Bacillus megaterium</i>	0.945
<i>Serratia marcescens</i>	0.943
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0.940
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.940
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0.930
<i>Sarcina lutea</i>	0.920
<i>Bacillus cereus</i>	0.920
<i>Bacillus subtilis</i>	0.900
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.860

Figure 15 : Activité de l'eau minimum nécessaire à la croissance des bactéries énoncées (Measures, 1975).

Les micro-organismes se développant dans des milieux aux concentrations élevées en sels sont dit halophiles alors que ceux ne supportant pas des concentrations élevées sont dits halotolérants.

Afin de ne pas éclater ou à l'inverse être plasmolysés dû au phénomène d'osmose, les micro-organismes ont développés des stratégies pour contrer ces stress osmotiques. Deux stratégies d'adaptation ont été décrites : l'augmentation intracellulaire des teneurs en sels dans le cytoplasme utilisé seulement chez les Halobacteriaceae dans des environnements riches en sels et la synthèse d'osmolytes organique.

a. Augmentation intracellulaire des teneurs en sels dans le cytoplasme

Dans le premier cas, une très forte concentration en sel est présente dans le cytoplasme afin de maintenir la pression osmotique à l'équilibre. Cette concentration peut aller jusqu'à 7 M de KCl alors que la majorité des halotolérants possèdent une concentration de 0,5 M. Une si forte concentration en sels nécessite une modification des protéines, qui contiennent plus d'acides aminés hydrophiles permettant de maintenir les interactions des protéines avec les molécules d'eau (Martin *et al.*, 1999). Les bactéries non halophiles extrêmes ne sont pas capables de supporter une si forte concentration cytoplasmique en sels. Afin de réguler la pression osmotique sur la paroi bactérienne, elles utilisent des osmolytes organiques également appelés osmo-protectants.

b. Synthèse d'osmolytes organiques

Les osmo-protectants sont des molécules permettant la régulation de l'osmose en s'accumulant ou non à l'intérieur de la cellule. Ces derniers sont définis comme molécules n'interagissant pas avec les protéines cytoplasmiques et ne modifiant pas le pH ni les processus intracellulaires (Sleator and Hill, 2002). Ils peuvent également servir de protection contre les fortes variations de températures et la dessiccation (Lippert and Galinski, 1992).

Dans le cas d'un milieu hypertonique, les solutés synthétisés ou emmagasinés vont empêcher la fuite des molécules d'eau du cytoplasme mais également permettre le maintien de la configuration structurale des protéines en se positionnant à proximité. De ce fait, les molécules d'eau interagissant avec les solutés vont indirectement influencer la conformation

des molécules. En cas de stress hyper-osmotique, la cellule va de manière quasi-instantanée augmenter l'entrée d'ions potassium dans la cellule (K^+). Afin de contrebalancer cette entrée massive d'ions chargés positivement, les bactéries à Gram négatif vont synthétiser du glutamate, chargé négativement (McLaggan *et al.*, 1994; Wood, 2011). Chez les bactéries à Gram positifs, ce phénomène semble moins observé, ces organismes tolérant mieux la concentration en ions potassium (Kempf and Bremer, 1998).

Dans un deuxième temps, la cellule va incorporer les osmo-protectants. Les bactéries peuvent utiliser de nombreux osmo-protectants mais les plus importants sont la glycine bétaine, la carnitine ainsi que la proline (Beumer *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1991). L'ectoïne est également un osmo-protectant retrouvé chez les bactéries (Eshinimaev *et al.*, 2007; Jebbar *et al.*, 1992; Lippert and Galinski, 1992). Les micro-organismes sont capables de synthétiser leurs propres osmo-protectants (Boch *et al.*, 1994; Boch *et al.*, 1997). Cependant, si de la glycine bétaine est présente dans le milieu extracellulaire, les voies de synthèse de cette dernière vont être réprimées chez *E. coli* (Eshoo, 1988) et *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997) car elle sera préférentiellement incorporée dans la cellule (Wood, 2011). La **figure 16** représente le système d'osmorégulation chez *E. coli*. En bas de la figure sont représentés les transporteurs des ions K^+ TrkA(G/H)/SapD et KdpFABC. Le complexe détectant les variations osmotiques est un système de régulation à deux composants : KdpD est une protéine kinase de détection située dans la membrane cellulaire et KdpE est une protéine partenaire régulatrice de réponse permettant la régulation de KdpFABC. L'aquaporine AqpZ permet le passage des molécules d'eau dans les deux sens selon les besoins. Les transporteurs ProP, ProU, BEtT et BetU permettent l'incorporation des osmo-protectants. MscL et MscS sont des canaux permettant de réguler la concentration en solutés hors de la cellule. Enfin, à l'intérieur de la cellule, les voies de synthèse des osmo-protectants sont représentées de manière simplifiée (Wood, 2006).

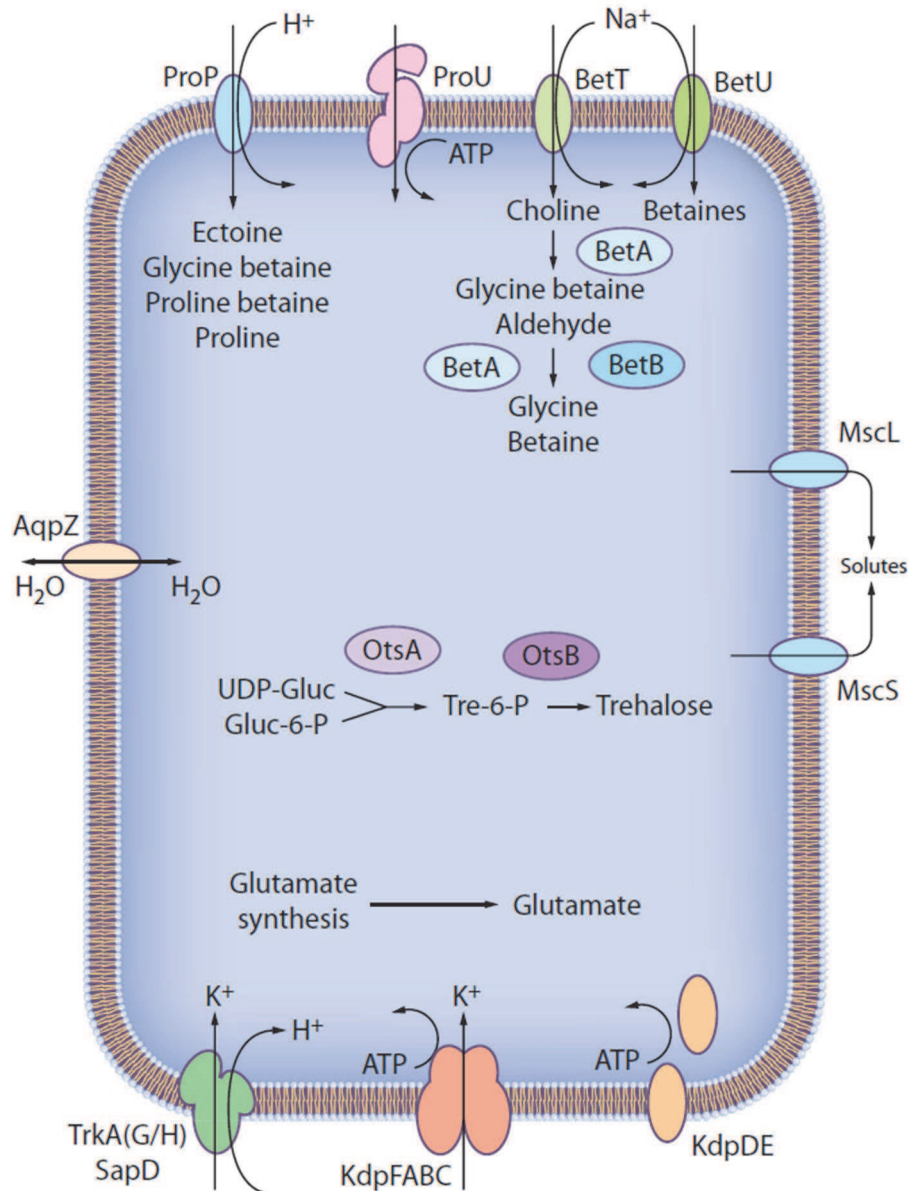


Figure 16 : Système d'osmorégulation chez *Escherichia coli*. (Wood, 2006). AqpZ : aquaporine, régulatrice du flux d'eau ; Prop, ProU, BetT, BetU, régulateurs et transporteurs des osmo-protectants ; MscL, MscS, régulateurs et transporteurs de solutés ; KdpD, KdpE, système de régulation à deux composants ; KdpF, KdpA, KdpB, KdpC, transporteurs d'ions potassium ; BetA, BetB, enzymes nécessaires à la synthèse de la glycine et de la bétaine ; OtsA, OtsB, enzymes nécessaires à la synthèse de tréhalose.

e) Importance de la nutrition lors de croissance bactérienne

Il serait malvenu de parler de la nutrition bactérienne sans évoquer la croissance bactérienne. La croissance microbienne se définit par l'augmentation du nombre de cellules d'une population. En effet, La nutrition permet aux cellules de synthétiser de la matière organique afin de pouvoir se diviser. Cependant, l'environnement fournissant les nutriments aux bactéries n'est pas constant. Dans ce cas, si le milieu est non renouvelé, la croissance cellulaire peut être divisée en 4 phases qui sont 1) la phase de latence (lag phase) où la bactérie va analyser son nouvel environnement afin de mettre en place les voies métaboliques nécessaires 2) la phase exponentielle de croissance où le nombre de cellules vient à doubler dans un intervalle de temps régulier 3) la phase stationnaire où il y a autant de divisions cellulaires que de cellules mortes 4) la phase de déclin où la majorité des cellules bactériennes sont mortes

La phase de latence présente un intérêt particulier lors d'un développement d'un milieu de culture.

1) Rôle primordial de la phase de latence.

La phase de latence est la phase de la croissance bactérienne qui est la moins étudiée. Ainsi, peu d'informations étaient connues sur cette phase hormis le fait que la cellule bactérienne répare sa membrane, suite aux dégradations subies lors du changement d'environnement, et que le potentiel de membrane diminuait (Desnues *et al.*, 2003). En 2011, Rolfe et son équipe ont mis au point un protocole permettant d'étudier la phase de latence de manière précise chez *Salmonella enterica*, grâce aux données des techniques de CHIP-chip (études des interactions entre protéines et ADN), de transcriptomique et d'ICP-AES (quantification des métaux) (Rolfe *et al.*, 2012). Durant les 2 heures de la phase de latence chez *S. enterica*, une variation d'expression de 1114 gènes a été observée sur une très courte durée (4 minutes), par rapport au profil d'expression avant l'entrée en phase de latence. Cela montre que la mise en marche de l'adaptation de la cellule à un nouveau milieu est quasi instantanée. Une augmentation de la taille de la cellule ainsi qu'une diminution du dioxygène de 10 % ont aussi été observées. Au terme de 20 minutes, l'expression de 1741 gènes avait

été modifiée. Ces 20 premières minutes sont les plus importantes de cette phase car c'est durant cette période qu'il y a une importante augmentation de l'expression des gènes du métabolisme nucléotidique, de la transcription, et de la synthèse des lipopolysaccharides et acides gras. Il est intéressant de noter que lors de ces 20 minutes, 20 gènes sont très fortement surexprimés dont 9 sont impliqués dans le stockage et l'utilisation du fer, 4 dans les noyaux fer-souffre et 2 impliqués dans l'absorption du manganèse. De plus, les concentrations intracellulaires du fer, du manganèse et du calcium sont les plus élevées durant ces 20 premières minutes par rapport aux autres phases de la croissance. Les enzymes de la glycolyse sont également les premières synthétisées afin de métaboliser au plus vite les sources de carbone.

La **figure 17** schématise les résultats de cette étude. La cellule représentée à gauche est en phase stationnaire, la cellule du milieu est en phase de latence après incorporation dans un nouveau milieu et la cellule à droite est en phase exponentielle. L'échelle de couleur correspond au taux de transcription du gène donné. On remarque que pendant la phase de latence, l'incorporation et l'utilisation des métaux est primordiale afin de mettre en place les systèmes enzymatiques nécessaires à la réparation de la cellule et au début d'entrée en phase exponentielle. Cette étude a montré que la phase de latence permet l'adaptation de la bactérie à un nouvel environnement de manière très rapide mais également que les oligo-éléments sont les premiers éléments nécessaires et assimilés par la cellule.

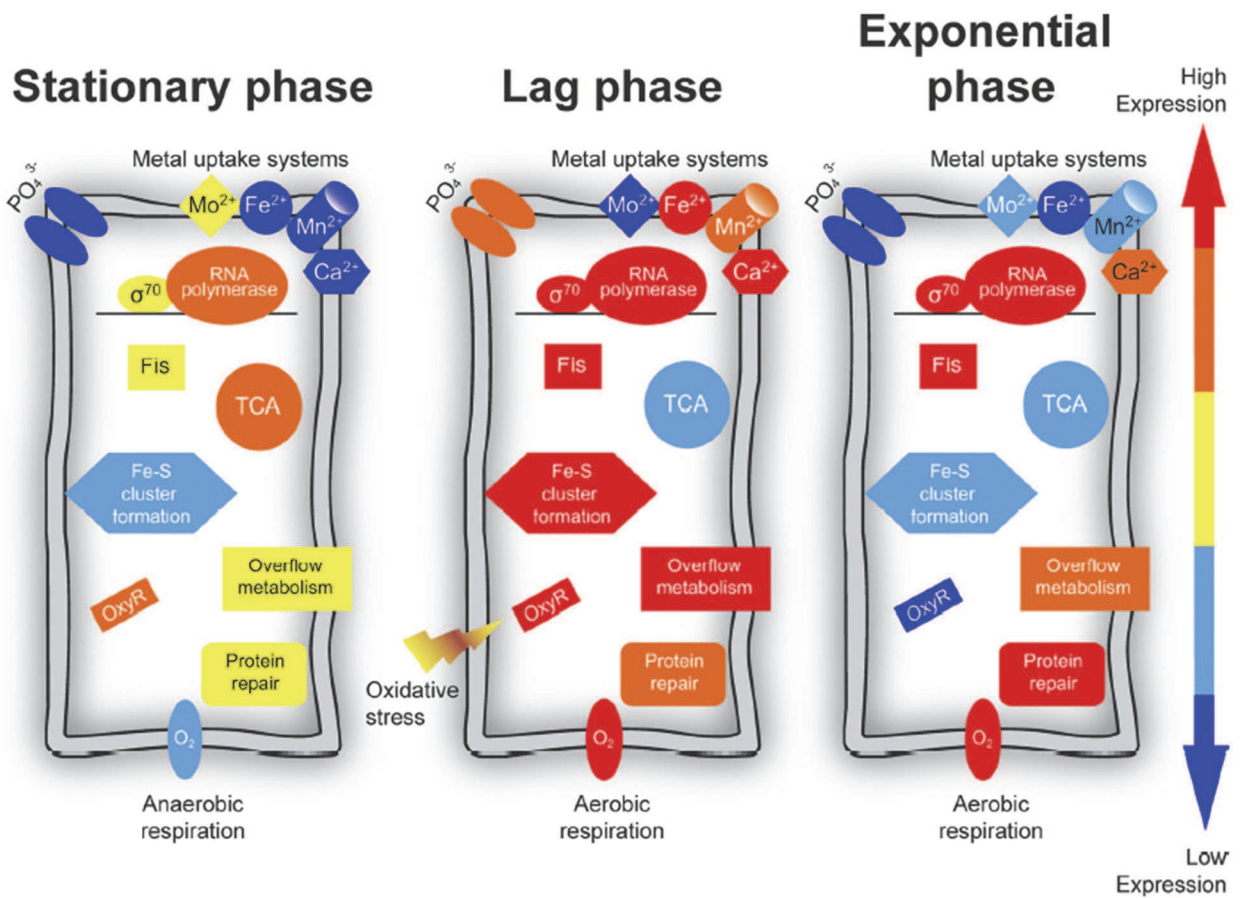


Figure 17 : Etat de la cellule bactérienne lors des différentes phases de croissance. Les protéines correspondantes aux gènes fortement transcrits sont représentées en rouge par rapport aux protéines des gènes faiblement transcrits en bleu. L'incorporation des métaux est le premier mécanisme mis en place (Rolfe *et al.*, 2012).

Nous venons de voir les principes généraux du métabolisme bactérien ainsi que les nutriments nécessaires à son bon fonctionnement. Cependant, des micro-organismes tels les méthylotrophes ont un métabolisme quelque peu différent notamment par les voies d'assimilation des métaux. Ils sont considérés comme des organismes à développement lent. De plus, leur croissance n'est pas optimale sur milieu « riche » et sont cultivés généralement sur des milieux pauvres en nutriments. Afin de comprendre leurs exigences, il est nécessaire d'étudier leur métabolisme plus en détail.

III. Métabolisme particulier : cas des méthylothropes

a) Généralités sur les méthylothropes

La méthylothropie a été découverte au début du XX siècle (Kaserer, 1905) mais il faudra attendre les années 60 pour que la communauté scientifique commence à comprendre l'ensemble des mécanismes mis en jeu. La première description détaillée est publiée en 1982 dans l'ouvrage *Biochemistry of Methylothropes* rédigé par Chris Anthony (Anthony, 1982). Encore actuellement, la méthylothropie se définit comme étant la capacité des micro-organismes à utiliser des substrats carbonés réduits, ne contenant pas de liaisons carbone-carbone, comme seules sources de carbone et d'énergie (Lidstrom, 2006). Chez certains organismes, la méthylothropie peut être facultative : cela signifie que des voies métaboliques permettant la dégradation de composés multi-carbonés sont présentes et peuvent être utilisées par l'organisme si besoin.

Les méthylothropes ont été considérablement étudiés ces dernières décennies car ils sont retrouvés dans de nombreux habitats aquatiques ou terrestres. De plus, ces micro-organismes contribuent à alimenter principalement le cycle du carbone mais également celui de l'azote et du soufre (Chistoserdova, 2011). L'intérêt de l'étude de leur métabolisme est également justifié par le fait que certains d'entre eux peuvent métaboliser des polluants environnementaux halogénés comme le chlorométhane ou le di-chlorométhane (Leisinger and Braus-Stromeyer, 1995). D'un point de vue phylogénétique, les méthylothropes sont pour la plupart répertoriés chez les alpha, bêta et gamma-protéobactéries et sont considérés comme hétérotrophes. Cependant, la définition de la méthylothropie a quelque peu évolué suite aux recherches récentes.

1) Les méthanotrophes

Les micro-organismes **méthylotrophes** peuvent utiliser, selon leur métabolisme, une large gamme de molécules à un carbone comme le méthanol, la méthylamine, la di et tri méthylamine, le diméthylsulfure, le formiate et le formamide entre autres. Certains de ces méthylotrophes sont également capables de métaboliser le méthane (CH_4). Ces micro-organismes sont les **méthanotrophes**. Leur particularité est de posséder l'enzyme *méthane mono-oxygénase* permettant d'oxyder le méthane en méthanol. Il existe la *méthane mono-oxygénase soluble* (sMMO) et la *méthane mono-oxygénase liée à la membrane* (pMMO) qui est l'enzyme retrouvée chez la quasi-totalité des méthanotrophes. Si les deux enzymes sont présentes dans le même organisme, la sMMO sert la plupart du temps de manière complémentaire à l'enzyme pMMO. Ces micro-organismes étaient considérés comme aérobies obligatoires car une molécule d'oxygène doit interagir avec une molécule de méthane (par l'intermédiaire de pMMO/sMMO) afin de former une molécule de méthanol. En 2010, il a été démontré que « *Candidatus Methyloirabilis oxyfera* » peut se développer dans des conditions d'anaérobiose stricte en convertissant deux molécules de monoxyde d'azote (NO) en une molécule de diazote (N_2) et une molécule de dioxygène (O_2) (Ettwig *et al.*, 2010). L'oxygène produit sera ensuite utilisé de manière « classique » afin de produire du méthanol.

Seuls quelques méthanotrophes peuvent utiliser des molécules à plusieurs carbones comme donneurs d'électrons et sources de carbone par rapport aux méthylotrophes qui sont nombreux à pouvoir utiliser des molécules à plusieurs atomes de carbone (Dedysh and Dunfield, 2011). Il existe différentes voies métaboliques afin de métaboliser les molécules à un carbone, certains méthylotrophes pouvant même en posséder plusieurs. Les méthanotrophes ont été classés selon l'organisation de leur membrane intracellulaire ainsi qu'en tenant compte des voies d'assimilation de composés à un carbone : les méthanotrophes de Type I utilisant le cycle du ribulose monophosphate et possédant des membranes internes composées de paquets de vésicules discoïdales répartis dans toute la cellule ; les méthanotrophes de Type II utilisant le cycle de la sérine et possédant des membranes internes appariées situées à la périphérie de la cellule (Hanson and Hanson, 1996; Trotsenko, 2008).

Cependant, ce classement est devenu quelque peu obsolète aux vues des nouvelles espèces découvertes.

2) Les différents cycles utilisés

Afin de simplifier la compréhension des voies d'assimilation des composés, la méthyliotrophie peut se diviser en trois étapes schématiques :

1) l'oxydation d'un substrat primaire méthylié afin de former du formaldéhyde ou du méthylène (Les voies qui ont été les plus étudiées sont l'oxydation du méthanol et celle de la méthylamine).

2) l'oxydation du formaldéhyde ou du méthylène qui a été couplé à un précurseur vitaminique, le tétrahydrofolate (H_4F) en CO_2 .

3) l'utilisation des molécules à 1C générées lors de l'étape 1 et/ou le CO_2 généré lors de l'étape 2 dans l'un des trois cycles que sont le cycle du ribulose monophosphate (RuMP), le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) et le cycle de la sérine (voir **figure 18**).

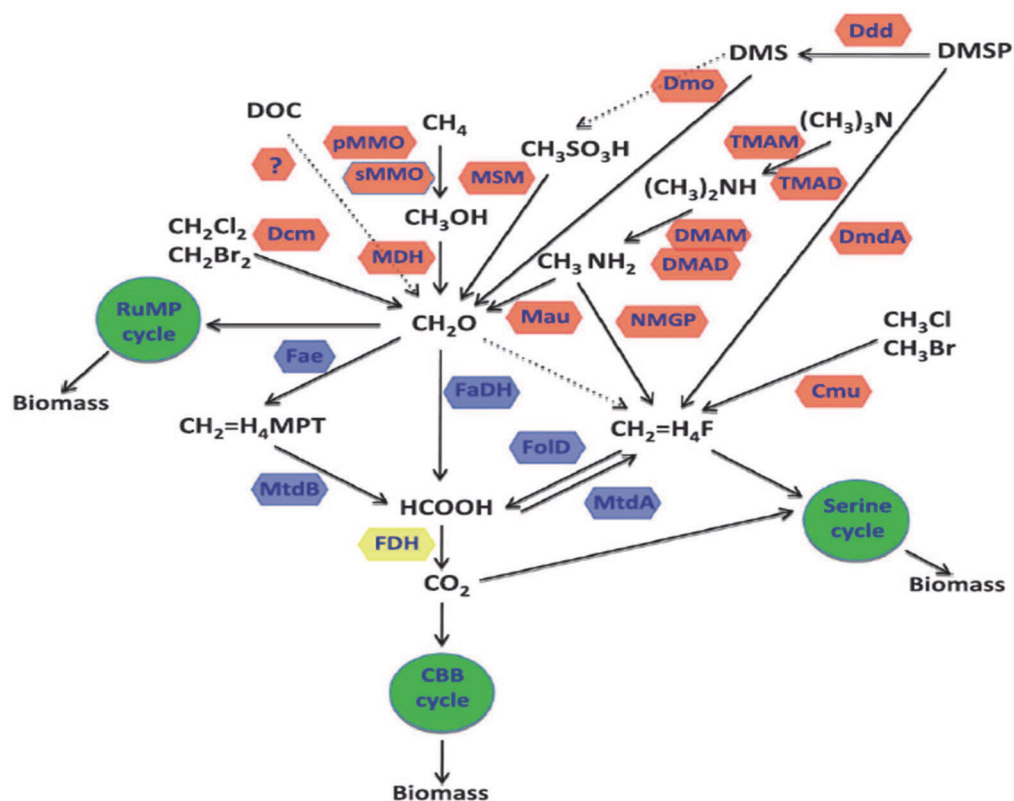


Figure 18 : Représentation simplifiée des différents « modules » retrouvés dans la méthyliotrophie. Les enzymes de couleur rouge sont utilisées lors de la première étape de la méthyliotrophie, les enzymes bleues lors de la deuxième étape et les jaunes lors de la troisième étape (Chistoserdova, 2011).

La méthylamine peut être directement oxydée en formaldéhyde par une seule enzyme selon le type bactérien : la méthylamine déshydrogénase (MADH) pour les bactéries à Gram négatif et la méthylamine oxydase pour les bactéries à Gram positif. Si la méthylamine n'est pas directement oxydée, le groupement méthyle va être transféré sur une molécule de glutamate. L'oxydation du formaldéhyde est une étape primordiale dans les voies. La difficulté de l'utilisation du formaldéhyde est la toxicité de cette molécule pour la cellule bactérienne. La concentration en formaldéhyde doit de ce fait être en constante régulation afin de maintenir cette concentration la plus faible possible. Etudions à présent les trois cycles plus en détails :

a. Le cycle Calvin-Benson-Bassham

Le cycle de Calvin-Benson-Bassham a été découvert dans les années 50 par les chercheurs éponymes. Ce cycle est retrouvé chez la majorité des organismes photosynthétiques autotrophes. En effet, chez ces organismes, la photosynthèse va permettre de stocker de l'énergie sous forme de molécule d'ATP et de NADPH et le CO₂ va servir exclusivement de source de carbone. Cette source de carbone va servir à produire des molécules d'*acide 3-phosphoglycérique* (PGA) destinées à alimenter les voies du métabolisme central. Pour rappel, ce cycle peut se décomposer en trois phases :

- 1) Réduction du CO₂ par la ribulose biphosphate carboxylase (RubisCO) (enzyme caractéristique du cycle CBB) sur une molécule de ribulose-1,5-bisphosphate afin de former une molécule à 6 carbones. Cette molécule instable, va être spontanément hydrolysée formant ainsi deux molécules de PGA (voir **figure 19**).

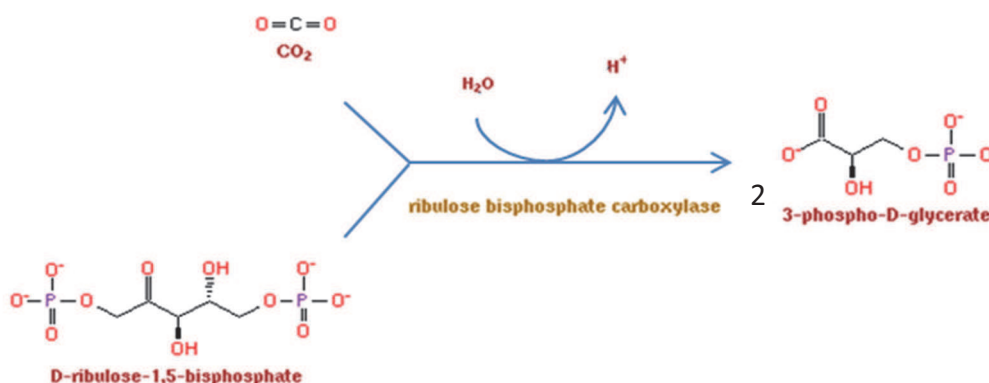


Figure 19 : Première étape du cycle de Calvin. Réaction du ribulose-1,5-bisphosphate avec une molécule de CO₂ formant deux molécules de 3-phospho-D-glycérate (<http://metacyc.org/>).

2) Réduction d'une molécule PAG en glycéraldéhyde-3-phosphate grâce à l'intervention d'une molécule d'ATP puis d'une molécule de NADPH. Une partie des molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate produites va être utilisée pour la formation de biomasse.

3) Transformation du glycéraldéhyde-3-phosphate afin de régénérer le cycle en produisant après plusieurs étapes du ribulose-1,5-bisphosphate.

Les méthylophiles utilisant ce cycle sont parfois appelés « méthylophiles autotrophes » voire même « pseudométhylophiles ». En effet, ce sont des molécules de CO₂ qui sont utilisées comme source de carbone et d'énergie après oxydation de composés à un carbone. Jusqu'à récemment, il n'y avait pas de **méthanotrophes** autotrophes identifiés (Lidstrom, 2006), c'est à dire transformant du méthane en CO₂ afin de l'incorporer au cycle CBB. En 2009, des chercheurs ont supposé que *Methylacidiphilum fumariolicum*, un organisme n'appartenant pas au phylum des protéobactéries mais à celui des verrucomicrobiales, était capable d'assimiler le méthane et d'utiliser le cycle CBB comme métabolisme central (Op den Camp et al., 2009). Malgré le fait que ce micro-organisme possède toutes les enzymes du cycle CBB, et ne possède pas certaines enzymes clés des deux autres cycles (Op den Camp et al., 2009), l'utilisation de ce cycle CBB a été mis en doute car il nécessite un apport important en molécules d'ATP (énergie apportée par la photosynthèse chez les plantes) (Chistoserdova et al., 2009). Il faut attendre 2011 pour qu'une équipe de chercheurs hollandais démontrent, par analyse transcriptomique et marquage isotopique des molécules de carbone, que le méthane transformé en dioxyde de carbone est bien la seule **source d'énergie** et que le CO₂ produit ainsi que le CO₂ atmosphérique vont être assimilés par le cycle CBB (Khadem et al., 2011) mettant en évidence l'autotrophie de ce méthanotrophe. Notons également que ce cycle peut être retrouvé chez des méthylophiles utilisant principalement le cycle de la sérine ou le cycle RuMP comme voie d'assimilation du carbone. Dans ce cas, le cycle CBB a un rôle de complémentation au cycle principal, encore mal compris (Rasigraf et al., 2014).

b. Le cycle du ribulose monophosphate

Le cycle RuMP est principalement utilisé par les méthanotrophes de types I. Ce cycle a été étudié pour la première fois chez le méthanotrophe *Methylomonas methanica* (appelé *Pseudomonas methanica* au moment de l'étude) par l'équipe de J.R. Quayle en 1965 (Johnson and Quayle, 1965; Kemp and Quayle, 1967). Dans le cadre de la méthylo-trophie, le cycle va convertir 3 molécules de formaldéhyde en une molécule à 3 atomes de carbone.

Ce cycle peut être également divisé en trois phases :

1) **Fixation du formaldéhyde** sur une molécule de ribulose-5-phosphate (d'où le nom du cycle) (5C) formant une molécule instable de 3-hexulose-6-phosphate (6C). Cette dernière va être restructurée en fructose-6-phosphate comme le montre la **figure 20** :

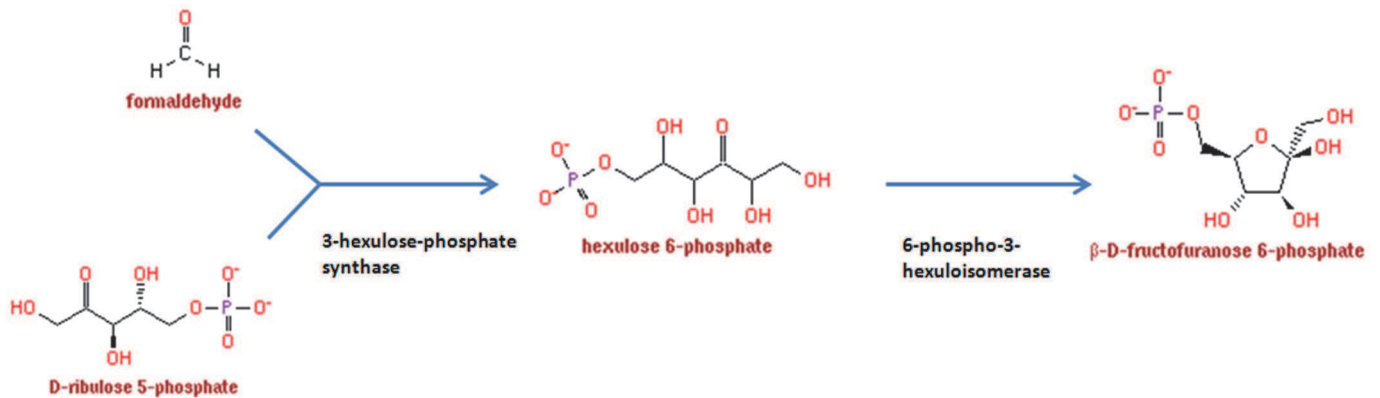


Figure 20 : Premières étapes du cycle RuMP : transformation du ribulose-5-phosphate en fructose-6-phosphate (<http://metacyc.org/>).

Notons que ces deux enzymes sont spécifiques à ce cycle. Cependant, Elle peuvent également avoir un rôle de détoxification des molécules de formaldéhyde chez des organismes n'utilisant pas ce cycle (Mitsui *et al.*, 2003).

2) **Phase de clivage du fructose-6-phosphate** en molécules à 3 atomes de carbone qui entreront dans les voies de biosynthèse. Pour cela, il existe deux voies possibles : la première voie va cliver la molécule de fructose en D-glycéraldéhyde 3-phosphate (3C) et dihydroxy-acétone phosphate (3C). Dans l'autre voie, le fructose est clivé en D-glycéraldéhyde 3-phosphate (3C) et en pyruvate (3C).

3) **Régénération du cycle** en produisant du ribulose-5-phosphate à partir du D-glycéraldéhyde 3-phosphate. Notons que plusieurs réactions différentes sont possibles permettant la régénération du cycle.

La **figure 21** illustre l'incorporation du cycle RuMP dans le métabolisme central. On y observe que le rôle clé des molécules de pyruvate (oxydé en acétyl-CoA) et de D-glycéraldéhyde 3-phosphate (oxydé en oxaloacétate) qui vont servir à alimenter le métabolisme central.

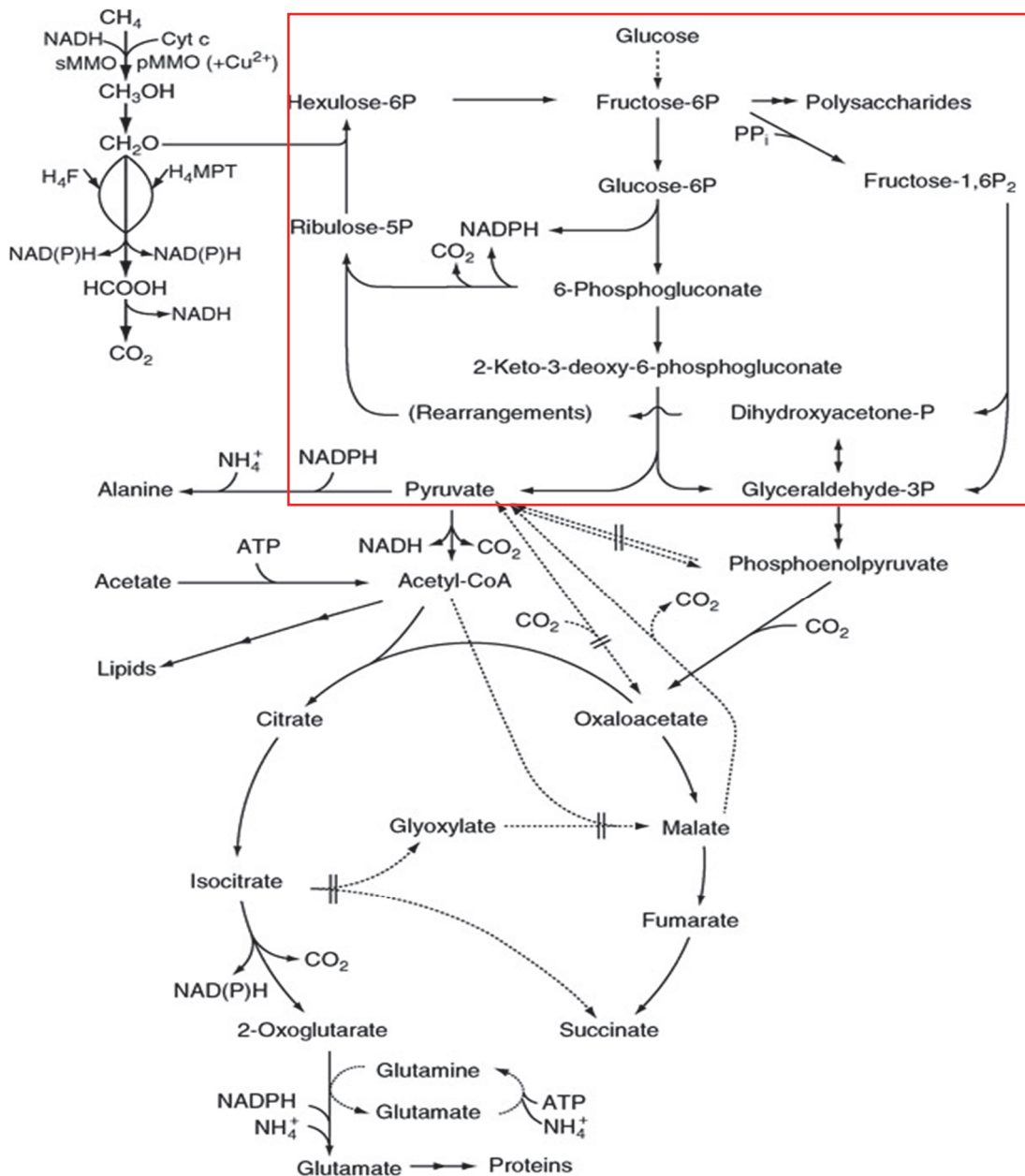


Figure 21 : Métabolisme central simplifié des méthanotrophes utilisant le Cycle RuMP (encadré en rouge) : Addition d'une molécule de formaldéhyde (1C) avec une molécule de ribulose-5P (5C) formant un sucre à 6 carbones. Il en résulte des molécules à 3 carbones qui vont alimenter le métabolisme central (Timmis, 2010).

c. Le cycle de la sérine

Le cycle de la sérine illustrée par la **figure 22** est principalement présent chez les méthylothropes de Type II. Il a été découvert par P.J. Large et J.R Quayle en 1962 (Large and Quayle, 1963). Ce cycle fait appel aux molécules de formaldéhyde en tant que source de carbone mais également aux molécules de CO₂ produites à partir du formate comme source d'énergie. Une fois le méthanol ou la méthylamine (selon la source de carbone utilisée) transformé en formaldéhyde, ce dernier va être métabolisé en une molécule de 5,10-méthylène tétrahydrofolate (méthylène-H₄F). La molécule de méthylène-H₄F va être le point d'entrée du cycle de la sérine. En effet, cette molécule va, avec l'aide d'une molécule d'eau, réduire une molécule de glycine afin de produire de la L-sérine. Ce cycle va permettre la production d'acétyl-CoA, molécule qui servira à alimenter le métabolisme central. Ce cycle est couplé avec des enzymes du cycle de Krebs (voir page 24) ainsi que le cycle du glyoxylate ou le cycle Ethylmalonyl-CoA. En effet, la régénération du glyoxylate est nécessaire pour assurer le renouvellement du cycle. Il existe pour cela deux possibilités : le cycle du glyoxylate (voir paragraphe suivant) présent chez la plupart des méthylothropes mais également et le cycle EMPC découvert récemment. Ce cycle permet de convertir deux molécules de formaldéhyde et une molécule de CO₂ en une molécule à trois carbonnes.

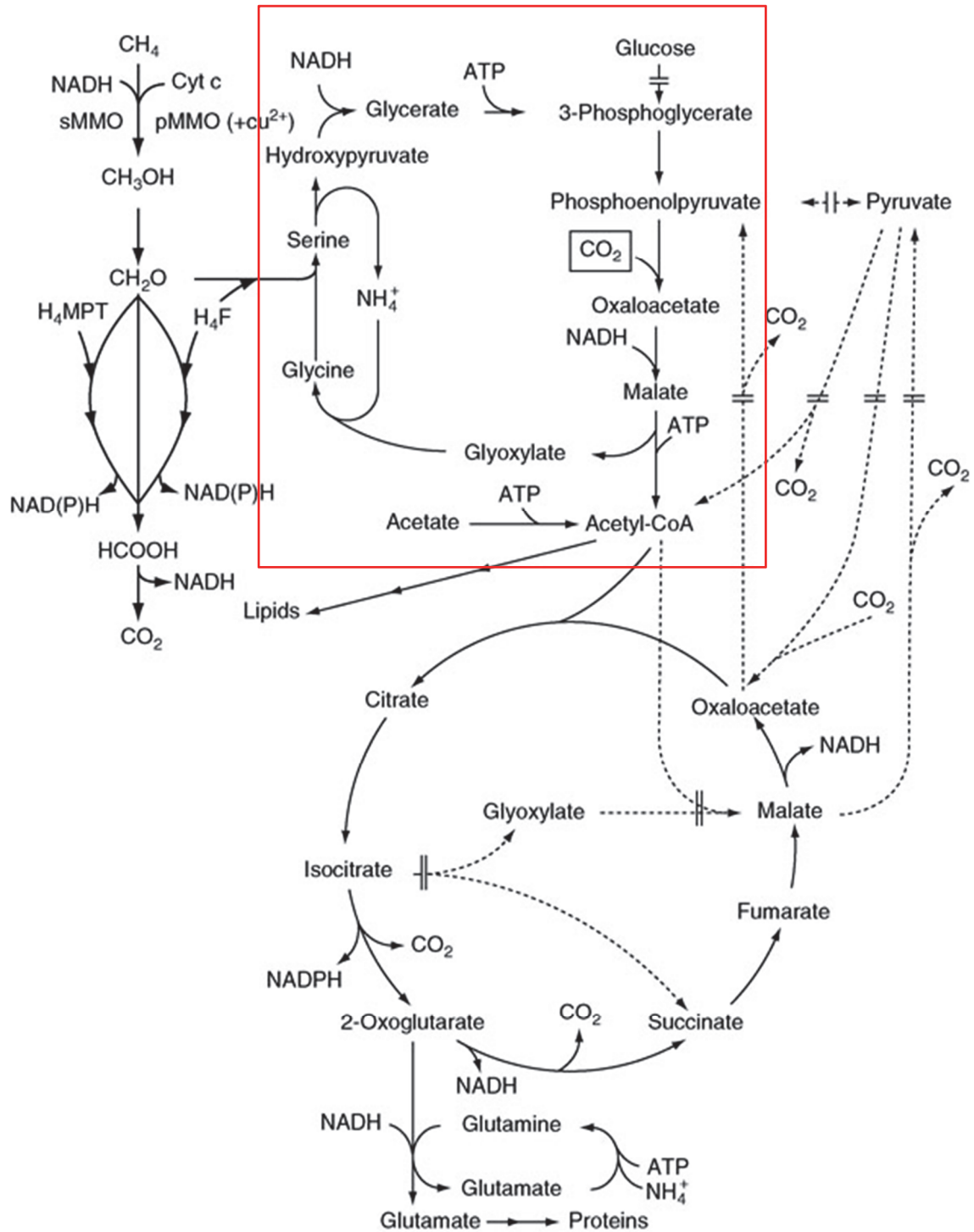


Figure 22 : Métabolisme central simplifié des méthanotrophes utilisant le cycle de la Sérine (encadré en rouge) : couplage d'une molécule de méthylène- H_4F avec une molécule de glycine afin de former de la sérine dans le but de produire de l'acétyl-CoA. L'acétyl-CoA va alimenter le métabolisme central comme notamment les voies de formation des lipides et des acides aminés (Timmis, 2010).

d. Le cycle du glyoxylate

Ce cycle a été décrit pour la première fois en 1957 par Kornberg. Il permet la conversion de deux molécules d'acétyl-CoA (molécule à deux carbones) en succinate (molécule à quatre carbones) afin d'alimenter les voies de biosynthèse. Ce cycle a également pour but de régénérer l'oxaloacétate utilisé dans le cycle TCA. Ce cycle est dénommé de la sorte car le glyoxylate tient un rôle clé. En effet, ce dernier va être transformé en malate par l'intermédiaire de la malate synthase et d'une molécule d'acétyl-CoA. Le malate (4C) ainsi formé va être oxydé en oxaloacétate (4C) par la malate déshydrogénase. C'est à ce moment du cycle qu'une deuxième molécule d'acétyl-CoA entre en jeu afin de générer du citrate (6C) grâce à la citrate synthase. Le citrate généré est transformé en isocitrate par une réaction d'isomérisation effectuée par une aconitase. Enfin, la dernière réaction de ce cycle est le clivage de la molécule d'isocitrate (6C) par l'isocitrate lyase en une molécule de succinate (4C) et une molécule de glyoxylate (2C). La molécule de succinate ainsi générée par le cycle va être directement utilisée dans les voies de biosynthèse. Le glyoxylate quant à lui, va servir à réalimenter le cycle (voir **figure 23**). Dans le cadre de la méthylophie, ce cycle est modifié afin de permettre la régénération de molécules de glyoxylate et alimenter le cycle de la sérine. En effet, comme vu précédemment, le malate formé dans le cycle de la sérine est séparé en glyoxylate et en acétyl-CoA. Ce dernier va, après une série de réactions, être oxydé en isocitrate. L'isocitrate va être clivé en glyoxylate grâce à une enzyme, l'isocitrate lyase. Ce cycle a fait l'objet de nombreuses interrogations chez les méthylophes car certaines de ces bactéries ne possèdent pas l'isocitrate lyase. De ce fait il est impossible d'obtenir la conversion de l'isocitrate en succinate et glyoxylate. Il faut attendre 1978 pour découvrir que ces méthylophes utilisaient un autre cycle, le cycle de l'éthylmalonyl-Coa. Ce cycle est expliqué en détails dans le paragraphe suivant.

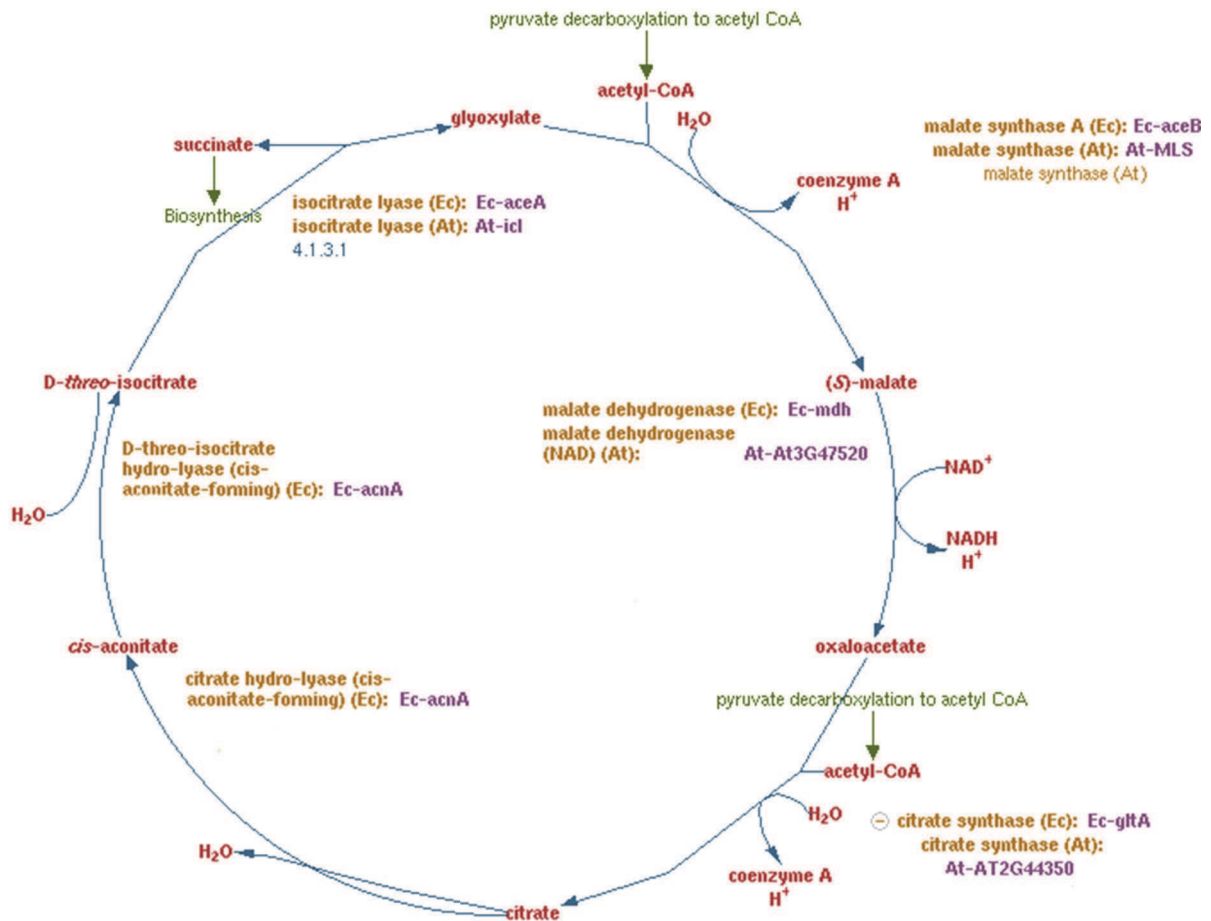


Figure 23 : Cycle du glyoxylate. Il permet la génération de glyoxylate par oxydation d'acétyl CoA avec de l'oxaloacétate (<http://metacyc.org/>).

3) Utilisation de composés multi-carbonés

Comme expliqué précédemment, il existe des méthanotrophes et méthylotrophes obligatoires mais également des méthanotrophes et méthylotrophes facultatifs. Les méthanotrophes facultatifs sont peu connus et leur métabolisme commence seulement à être étudié. *Methylocystis* strain SB2 est le premier méthanotrophe dont la croissance sur méthane mais également sur éthanol (2C) a été étudié (Vorobev *et al.*, 2014). Il en résulte que lors de la croissance sur éthanol, les voies métaboliques sont exprimées de manière totalement différente. En effet, l'expression des enzymes du cycle de la sérine va être diminuée alors que celle du cycle des acides tricarboxyliques sera fortement augmentée. Les enzymes du cycle de

l'EMCP (cycle Ethylmalonyl-CoA, P.63) sont exprimées de la même manière. Les analyses transcriptomiques ont montré que l'éthanol, une fois incorporé dans la cellule était métabolisé en acétaldéhyde, à son tour métabolisé en acétate afin de produire de l'acétyl-CoA. A partir de là, l'acétyl-CoA va pouvoir être incorporé dans le cycle des acides tricarboxyliques afin de générer de l'énergie mais également dans le cycle de l'EMCP afin de générer de la biomasse (voir **Figure 24**). Cette étude nous montre que le métabolisme de certains méthylophiles peut s'adapter à son environnement grâce à une certaine réversibilité de ces voies métaboliques. Nous verrons par la suite l'utilisation de composés multi-carbones chez le méthylophile facultatif *Methylobacterium extorquens*.

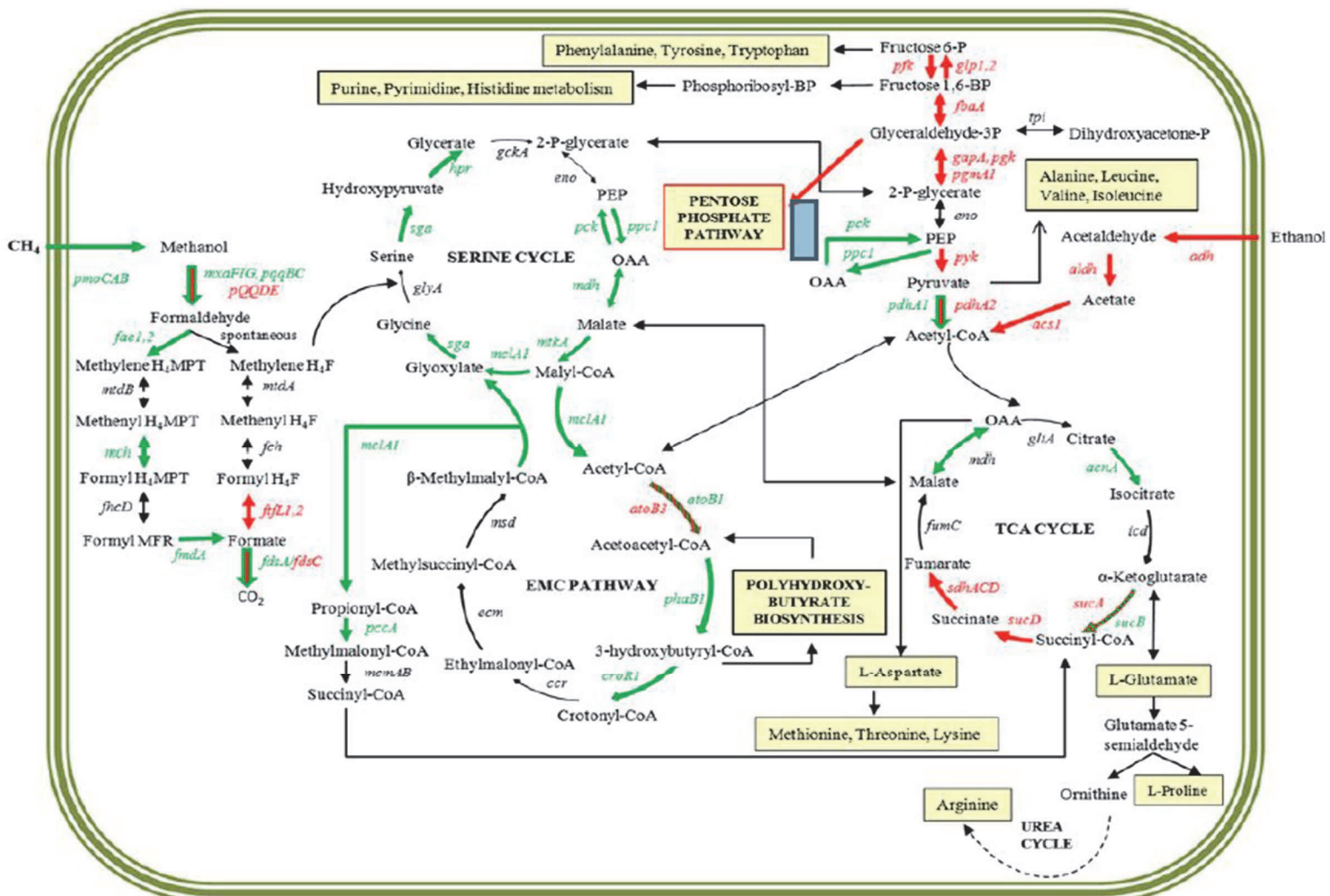


Figure 24 : Assimilation de différentes sources de carbone chez le méthanotrophe *Methylocystis* strain SB2. A gauche de la Figure, assimilation du méthane. Les voies utilisées spécifiquement due à son assimilation sont représentées en vert. A droite, assimilation de l'éthanol, ses voies spécifiques sont représentées en rouge (Vorobev *et al.*, 2014).

b) *Methylobacterium sp.*

Le genre *Methylobacterium* appartient à la classe des alpha-protéobactéries. Ce sont des bactéries à Gram négatif majoritairement retrouvées en association avec des plantes, soit sur leurs feuilles (Knief *et al.*, 2010) également appelé phyllosphère, soit au niveau de leurs racines (Schauer and Kutschera, 2008). Leurs interactions particulières avec les plantes font que ce genre bactérien est très étudié, notamment *Methylobacterium nodulans* sécrétant des facteurs Nod qui permettent la symbiose avec certaines plantes comme *Crotalaria* (Jourand *et al.*, 2005) ou *Lotononis* (Jaftha *et al.*, 2002). De manière simplifiée, *M. nodulans* va s'attacher sur les poils racinaires de la plante et sécréter une molécule appelée facteur Nod. Ce facteur va induire la courbure du poil racinaire permettant aux bactéries de se développer dans la racine de la plante. Ces dernières vont y fixer l'azote que la plante pourra utiliser. En contrepartie, la plante fournit les nutriments nécessaires aux bactéries (Carroll *et al.*, 1985; Downie, 2014). L'environnement de ces micro-organismes peut être également très varié voir extrême. En effet, des bactéries du genre *Methylobacterium* ont été retrouvées dans le sol de l'antarctique (Yergeau *et al.*, 2008) ainsi que dans des sols très arides (Csotonyi *et al.*, 2010).

Le métabolisme des sources de carbone varie selon les différentes espèces. Le **tableau 4** résume les différentes sources de carbone assimilées par les principales espèces de *Methylobacterium* les plus étudiées.

Carbon source	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
D-Glucose	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Fucose	-	-	+	+	+	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Fructose	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
L-Glutamate	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Citrate	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Sebacate	+	-	+	V	+	NA	-	-	-	-	-	NA	NA	-	NA
Acetate	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Betaine	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	NA	+	NA
Tartrate	-	-	-	-	V	-	V	-	-	V	-	+	NA	+	NA
Ethanol	W	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NA	+	NA
Methane	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	NA	NA	+	NA
Methylamine	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	NA	+	NA
Dimethylamine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	NA	NA	-	NA
Trimethylamine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	NA	NA	-	NA
Nutrient agar	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	NA	NA	+	NA

Tableau 4 : Sources de carbone assimilées par différentes souches de *Methylobacterium*. 1 : *M. CBMB20T* ; 2 : *M. CBMB110* ; 3 : *M. radiotolerans* ; 4 : *M. mesophilicum* ; 5 : *M. fujisawaense* ; 6 : *M. suomiense* ; 7 : *M. extorquens* ; 8 : *M. organophilum* ; 9 : *M. rhodesianum* ; 10 : *M. zatmanii* ; 11 : *M. rhodinum* ; 12 : *M. nodulans* ; 13 : *M. hispanicum* ; 14 : *M. populi* ; 15 : *M. adhaesivum*. + signifie la croissance ; - absence de croissance ; V la croissance est aléatoire ; W faible croissance ; NA données indisponibles (Madhaiyan *et al.*, 2007).

1) Etude de *Methylobacterium extorquens*

M. extorquens a été décrit pour la première fois en 1961 par D. Peel et J.R Quayle qui le dénommèrent *Pseudomonas extorquens* (Peel and Quayle, 1961). Cette bactérie se développe sous la forme d'un bacille de couleur rose due à la sécrétion de caroténoïdes (Konovalova *et al.*, 2007). Ce micro-organisme est majoritairement retrouvé dans la phylosphère car il peut utiliser le méthanol relargué par les feuilles des plantes (Sy *et al.*, 2005). *M. extorquens* AM1 est l'un des organismes méthylothropes les plus étudiés du fait de sa capacité à utiliser des composés en 2C, 3C et 4C. Il a permis notamment de caractériser le cycle de la sérine (Large and Quayle, 1963) ainsi que la voie d'oxydation du formaldéhyde et la voie de substitution permettant de renouveler le glyoxylate, l'EMPC. Son génome,

entièrement séquencé et analysé en 2009 (Vuilleumier *et al.*, 2009), a mis en évidence les clusters de gènes utilisés pour la méthylothrophie. Il en résulte que pas moins de 70 gènes sont utilisés dans la méthylothrophie et sont localisés sur 8 régions différentes du chromosome. Des études de flux métaboliques ont également montré que le réseau métabolique de *M. extorquens* contenait 1139 réactions et mettait en jeu 977 métabolites (Peyraud *et al.*, 2011).

a. Métabolisme de *M. extorquens*

Voyons de manière plus précise les différentes étapes du métabolisme de *M. extorquens* AM1 :

(i) Fixation des molécules à un atome de carbone

Les molécules 1C que peut utiliser *M. extorquens* sont le méthanol et la méthylamine. Ces deux molécules sont transformées en formaldéhyde à l'extérieur de la cellule. Dans le cas du méthanol, l'enzyme responsable de cette transformation est la *méthanol déshydrogénase*. Les accepteurs d'électrons de cette réaction sont des cytochromes C1. Pour l'oxydation de la méthylamine, il s'agit de la méthylamine déshydrogénase. L'accepteur d'électrons pour cette réaction est l'amicyanine formant ainsi de l'ammonium (voir **figure 25**).

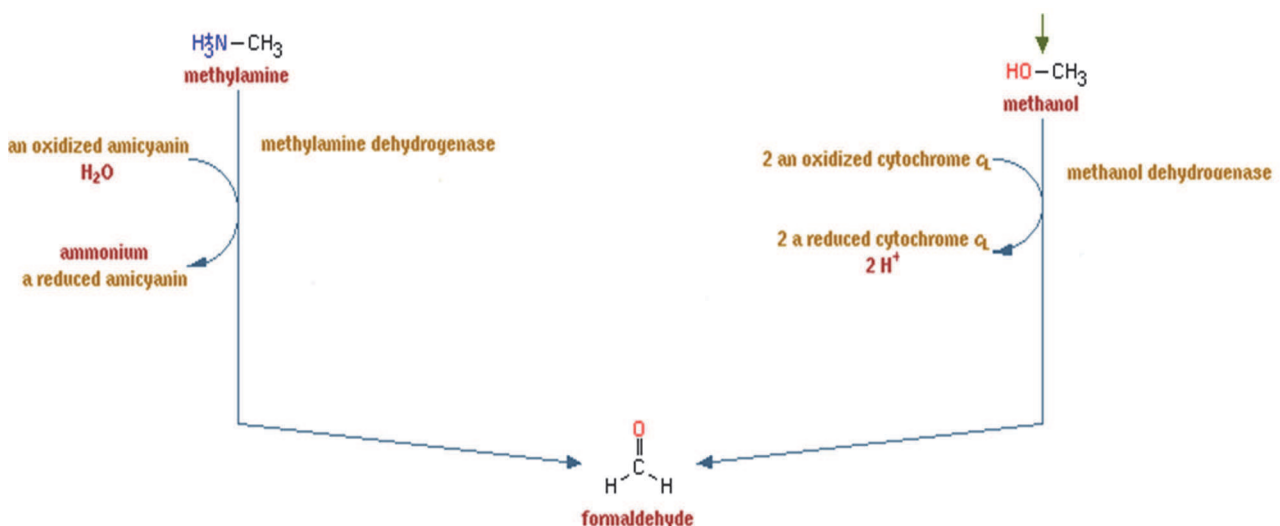


Figure 25 : Réactions permettant la formation de formaldéhyde à partir de méthylamine ou de méthanol. Pour l'oxydation de la méthylamine, l'amicyanine est l'accepteur d'électrons. Pour l'oxydation du méthanol, il s'agit du cytochrome C1 (<http://metacyc.org/>).

(ii) Oxydation du formaldéhyde

Le formaldéhyde produit lors des étapes décrites précédemment peut être oxydé de deux manières : soit il sera couplé à une molécule de tétrahydrofolate (H_4F) de manière spontanée formant ainsi une molécule de 5,10-méthylène tétrahydrofolate (méthylène- H_4F), soit il va être transformé en une molécule de formate après avoir été couplé à une molécule de tétrahydrométhanoptérine. Le formate est alors métabolisé soit en CO_2 , soit également en méthylène H_4F .

La réaction spontanée du couplage du formaldéhyde avec H_4F , molécule dérivée de l'acide folique (vitamine B9), représentée **figure 26**, est sujette à discussions depuis que M.E. Lidstrom et son équipe ont montré que des mutants de *M. extorquens*, ne pouvant pas transformer le formate en méthylène H_4F , étaient incapables de se développer en présence de méthanol comme seule source de carbone (Crowther *et al.*, 2008).

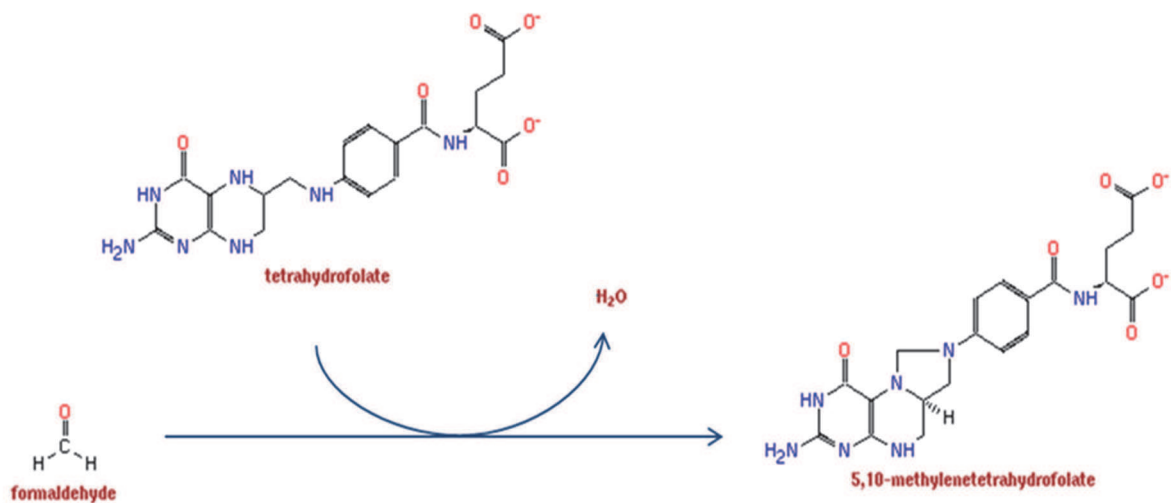


Figure 26: Oxydation spontanée du formaldéhyde avec une molécule de tétrahydrofolate (<http://metacyc.org/>).

Si cette réaction ne peut être spontanée, cela signifie que la formation de formate est un point clé du fonctionnement de la méthylothrophie utilisée par *M. extorquens*. En effet, le formate serait le carrefour entre l'assimilation et la dissimilation du carbone. Dans le cas de la dissimilation, l'oxydation du formate va permettre la production de CO_2 conduisant à la

production d'énergie par la formation de NADH. Pour la voie de l'assimilation, le formate va être transformé en méthylène H_4F . Dans ce dernier cas, du formyl H_4F sera produit, pouvant ainsi alimenter si besoin la voie de synthèse des purines. La voie du tétrahydrofolate (H_4F) utilise une enzyme bifonctionnelle, FoLD. Cette enzyme possède une activité déshydrogénase ainsi qu'une activité cyclohydrolase (Chistoserdova *et al.*, 2009). La plupart des Méthylotrophes possèdent cette enzyme. Cependant, *M. extorquens* ne la possède pas. Ce dernier possède à la place MtdA et Fch, chacune jouant l'un des rôles de FoLD (Vorholt, 2002). La **figure 27** illustre les réactions expliquées ci-dessus :

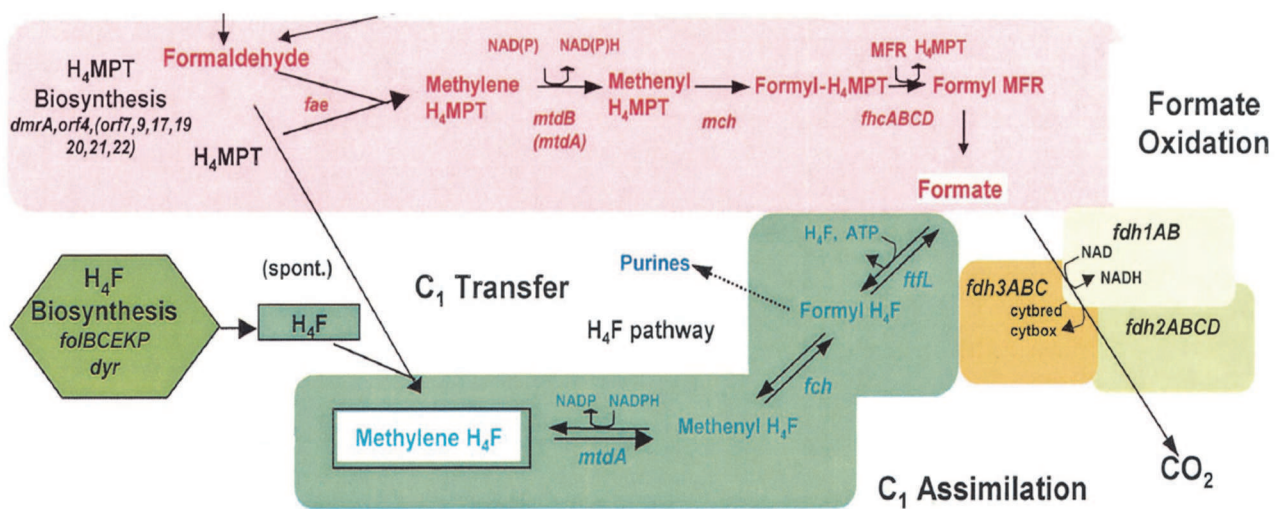


Figure 27 : Assimilation du formaldéhyde par *Methylobacterium extorquens* (Chistoserdova *et al.*, 2003).

(iii) Métabolisme central

Le méthylène- H_4F va être le point d'entrée du cycle de la sérine. Ce cycle est relié avec une partie du cycle TCA, de la gluconéogenèse ainsi que la voie d'Entner-Doudorof. Dans le cas de la croissance sur méthanol, la majorité du carbone assimilé via le cycle de la sérine va alimenter la gluconéogenèse. Une plus petite partie va servir à générer des précurseurs métaboliques tels que l'oxaloacetate ou le pyruvate via les cycles de la sérine et TCA. Le cycle EMCP (voir paragraphe suivant), quant à lui, va permettre de régénérer le glyoxylate permettant ainsi de renouveler le cycle de la sérine (voir **figure 28**). Notons que lors de la

croissance sur méthanol, le cycle des acides tricarboxyliques ne semble pas être effectué totalement car la déshydrogénase 2-oxoglutarate ne semble pas être synthétisée.

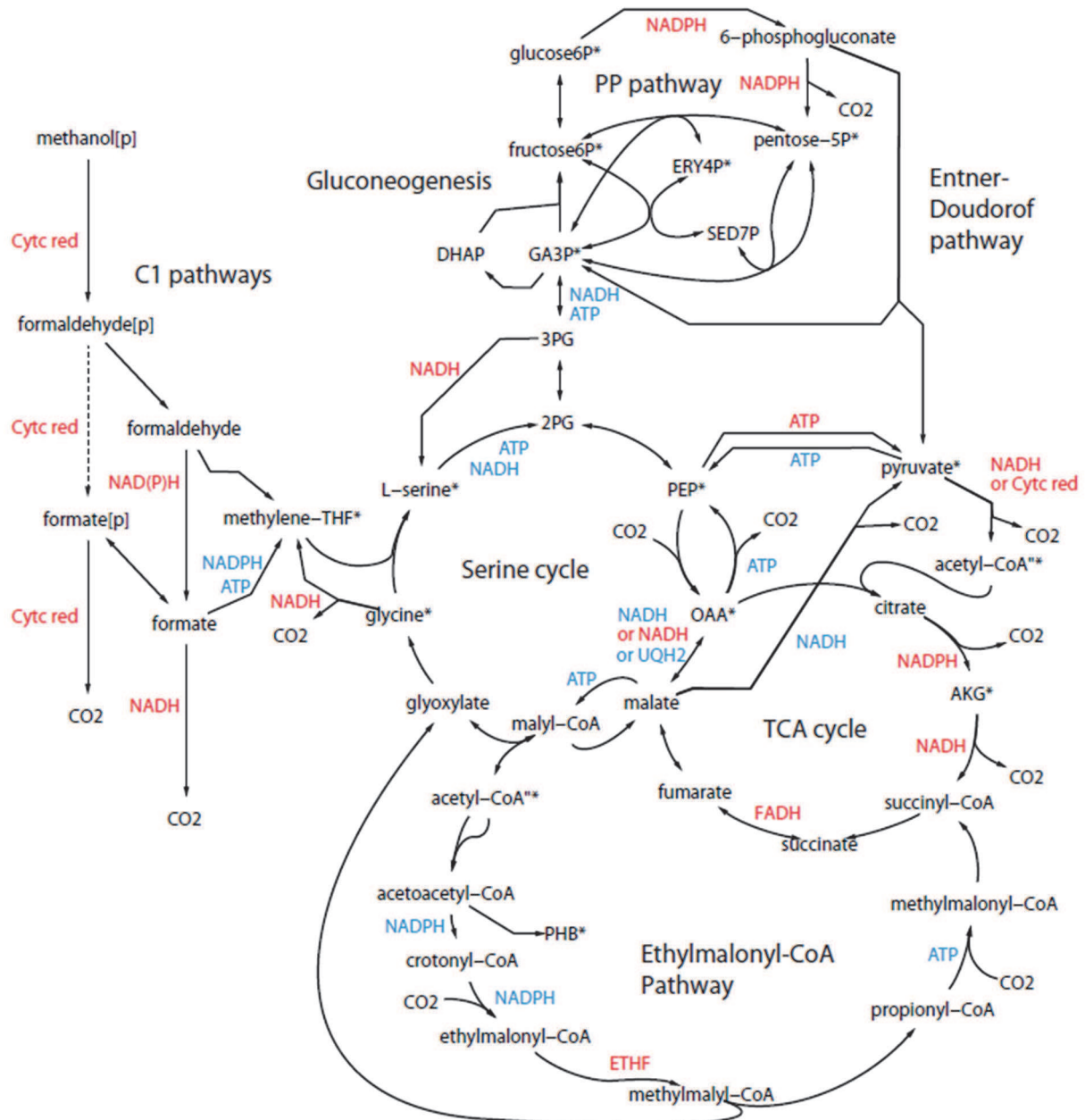


Figure 28 : Métabolisme central de *Methylobacterium extorquens* (Peyraud *et al.*, 2011). Les cofacteurs utilisés lors des réactions sont représentés en rouge et ceux produits en bleu.

(iv) Le cycle Ethylmalonyl-CoA

Ce cycle (EMCP) a été découvert il y a quelques années seulement (Erb *et al.*, 2007) (Peyraud *et al.*, 2009) en essayant de comprendre comment les organismes méthylophiles ne possédant pas l'enzyme isocitrate lyase, et de ce fait ne pouvant pas produire de glyoxylate, pouvaient se développer. Des études par marquage isotopique et spectrométrie ont montré qu'une voie différente du cycle du glyoxylate existait, la voie de l'Ethylmalonyl-CoA. Cette voie commence par la combinaison de deux molécules d'acétyl-CoA afin de former de l'acétoacétyl-CoA. Du crotonyl-CoA va être formé puis couplé à une molécule de CO₂ afin de former de l'Ethylmalonyl-CoA, molécule qui a donné son nom au cycle. De là est métabolisé du méthylmalonyl-CoA qui va pouvoir, soit être incorporé dans le cycle TCA soit produire du glyoxylate. Chez *M. extorquens*, l'équation finale de ce cycle est la suivante : $2 \text{ acétyl-CoA} + 2 \text{ CO}_2 + 2 \text{ H} = 1 \text{ glyoxylate} + \text{H}^+ + 1 \text{ succinyl-CoA}$. Ce cycle nécessite la synthèse d'un nombre plus important d'enzymes que pour le cycle du glyoxylate mais permet d'alimenter deux cycles à la fois et permet un métabolisme plus modulable, pouvant s'adapter à de nombreuses conditions environnementales.

b. Utilisation de molécules multi-carbonées

Nous venons de voir le fonctionnement du métabolisme de *M. extorquens* lorsqu'il utilise le méthanol ou la méthylamine comme source de carbone, utilisant donc le cycle de la sérine afin de générer de l'acétyl CoA pour alimenter le métabolisme central. Cependant, *M. extorquens* étant une méthylophile facultative, elle est capable de se développer avec des molécules à 2, 3 ou 4 atomes de carbone comme l'acétate (2C), l'oxalate (2C), le lactate (3C), le pyruvate (3C), le succinate (4C) ou le malate (4C) (Peyraud *et al.*, 2011). Afin de déterminer la source de carbone la plus efficace en terme de croissance, le temps de division de *M. extorquens* a été étudié par culture en bioréacteur. L'étude de Peyraud et ses collaborateurs (2011) montre qu'en présence de méthanol, le temps de division de la bactérie est de 4 heures, 6 heures en présence d'oxalate et 10 heures en présence d'acétate. Il est intéressant de comprendre l'assimilation de ces molécules multi-carbonées afin de cibler des molécules clés permettant de favoriser la croissance de cette bactérie. Des études plus

approfondies ont été réalisées par protéomique, marquage isotopique et mutagénèses afin de mieux appréhender la modularité des voies métaboliques de cette dernière.

(i) Croissance sur acétate

La croissance de *M. extorquens* sur acétate a été étudiée par Kathrin Schneider et ses collaborateurs (Schneider *et al.*, 2012a). L'acétate de formule chimique CH_3COO^- peut être assimilé par la voie des acides tricarboxyliques mais également du cycle EMC. Lors de l'incorporation de l'acétate dans la cellule, ce dernier est transformé en acétyl-CoA par l'acétyl-coenzyme A synthétase. L'acétyl-CoA est alors incorporé dans le cycle des acides tricarboxyliques afin de former du citrate ainsi que dans le cycle de l'EMC pour former du 3-hydroxybutyryl-CoA mais également du malate (alimentant le cycle de la sérine et le cycle TCA) (voir **figure 29**). Dans cette configuration, l'acétate va être majoritairement assimilé par le cycle TCA (effectué en entier par rapport à la croissance sur méthanol) afin de produire de la biomasse ainsi que de l'énergie. L'acétate assimilé par le cycle EMP va quant à lui produire du glyoxylate afin de métaboliser la glycine et la sérine. Les analyses protéomiques ont permis d'identifier 2600 protéines produites lors de la croissance sur acétate montrant très peu de différence avec une croissance sur méthanol. Ce résultat n'explique la différence de vitesse de croissance observé par Peyraud *et al.*, 2011, mais on peut émettre l'hypothèse que cette différence provient des flux métaboliques qui ne sont pas utilisés de manière optimale lors de la croissance sur acétate. Cet exemple met en évidence la modularité métabolique de *M. extorquens*. En effet, cette bactérie peut facilement adapter son métabolisme selon la source de carbone disponible car il utilise le même pool d'enzymes quelles que soient les voies métaboliques mises en place, permettant ainsi une adaptation rapide à son environnement.

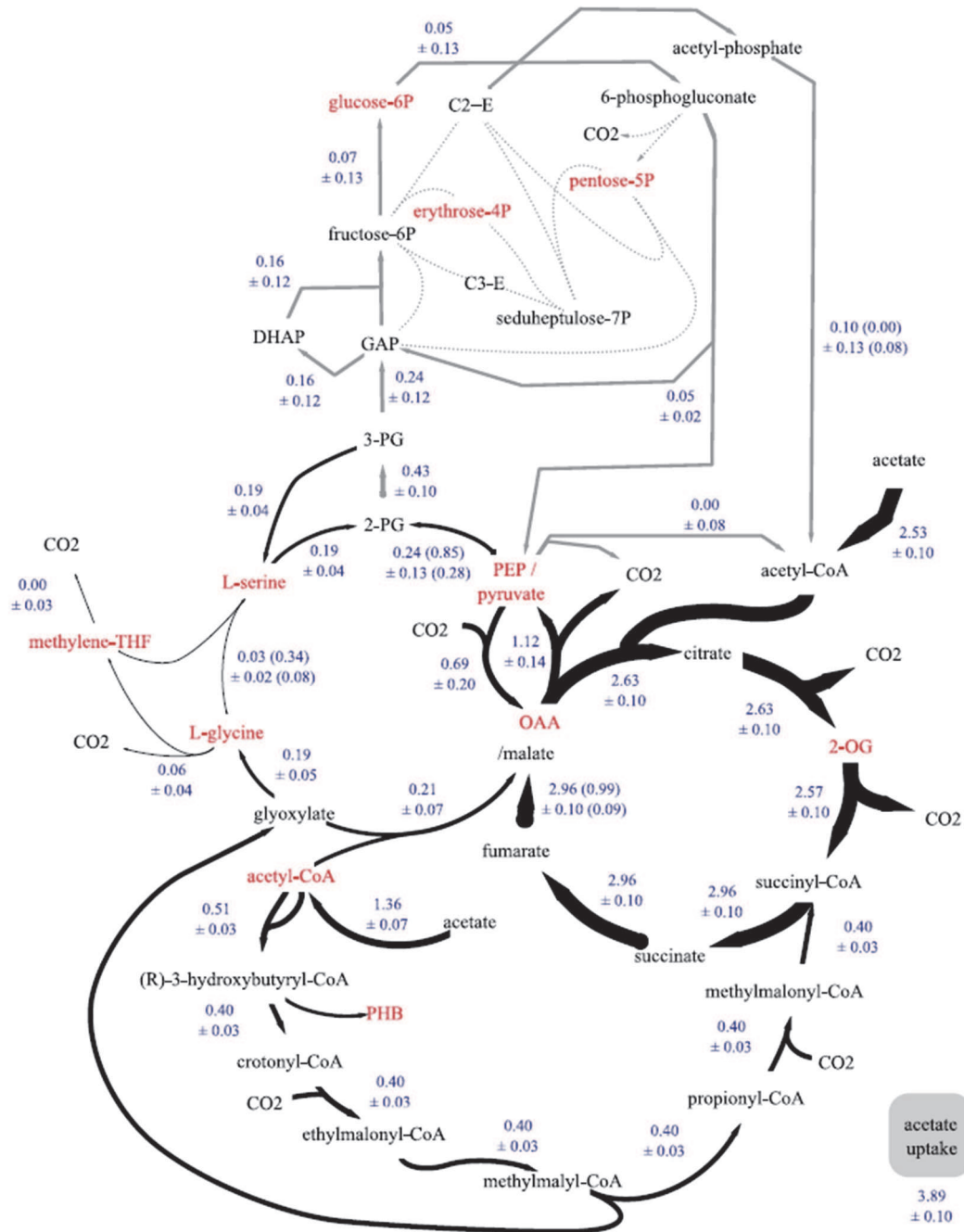


Figure 29 : Métabolisme de *M. extorquens* lors de la croissance sur acétate (2C). L'acétate va alimenter le cycle des acides tricarboxyliques ainsi que le cycle de l'Ethylmalonyl-CoA. Les valeurs en bleus indiquent la valeur du flux métabolique (mmol.g⁻¹.h⁻¹) (Schneider *et al.*, 2012a).

(ii) Croissance sur oxalate

L'étude de la croissance de *M. extorquens*, avec l'oxalate comme seule source de carbone, révèle un autre exemple de l'adaptabilité de son métabolisme. En effet, l'analyse des flux métaboliques indique que l'oxalate, une fois métabolisé en oxalyl-CoA par l'oxalyl-CoA décarboxylase, peut directement régénérer le glyoxylate et ainsi éviter l'utilisation de la voie EMP, coûteuse en énergie (**figure 30**) (Schneider *et al.*, 2012b)

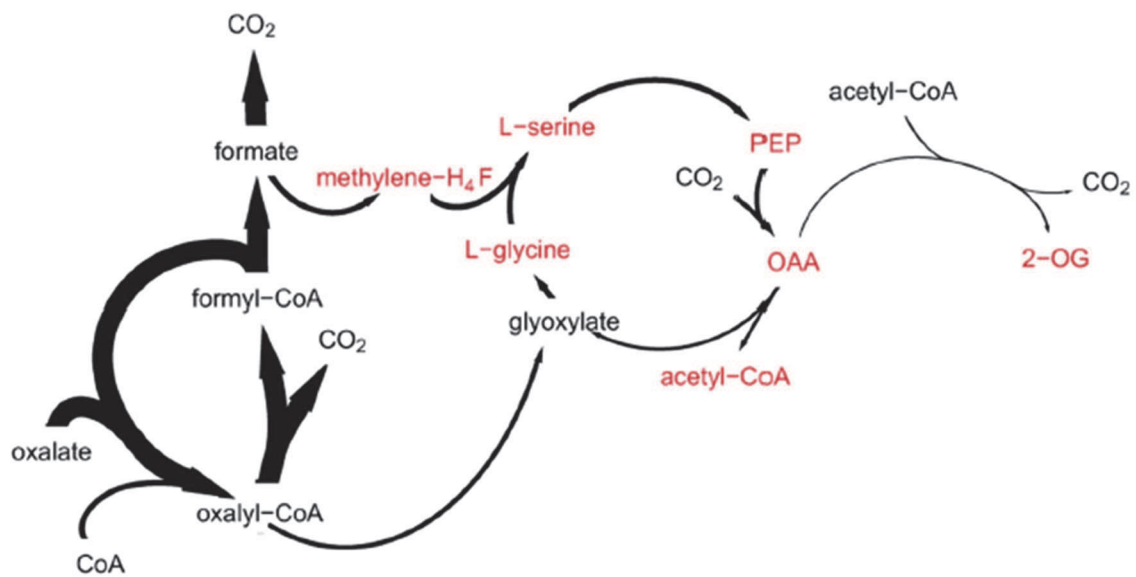


Figure 30 : Voie supposée de l'assimilation de l'oxalate chez *M. extorquens* (2C). L'oxalate peut alimenter le cycle de la sérine après transformation en oxalyl-CoA. L'oxalyl-CoA peut également être oxydé en glyoxylate, la voie de l'EMP n'étant alors plus utile (Schneider *et al.*, 2012b).

L'analyse protéomique montre que le cycle de l'EMP est quand même utilisé, mais de manière assez faible. Le cycle de la sérine est également altéré car la production d'acétyl-CoA n'est plus obligatoire pour alimenter le Cycle de l'EMP. Si l'acétyl-CoA est quand même synthétisé, ce sera dans le seul but d'alimenter les voies de biosynthèse. Les chercheurs ont également montré que des mutants ne possédant pas l'enzyme permettant la transformation de l'oxalyl-CoA en glyoxylate (oxalyl-CoA réductase) pouvaient se développer mais avec un plus faible taux de croissance.

(iii) Croissance sur des molécules à 3 et 4 atomes de carbone

Les molécules à 3 et 4 carbones sont directement assimilées soit dans le cycle de la sérine, soit dans le cycle TCA. Le cycle TCA doit être fonctionnel car c'est le seul moyen de générer de l'Acetyl-CoA. En effet, des mutants ne possédant pas la pyruvate déshydrogénase, qui permet de métaboliser du pyruvate produit par le cycle TCA en l'Acetyl-CoA, ne peuvent pas se développer sur du succinate (4C) ou du pyruvate (3C) (Van Dien *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que selon la source de carbone utilisée, le rendement du métabolisme (mesuré par la quantité de biomasse produite) ne sera pas le même. Van Dien et Lidstrom ont développé un modèle mathématique afin de calculer le rendement du métabolisme de *M. extorquens* lors de sa croissance sur méthanol, pyruvate et succinate. Les résultats de l'analyse montrent que le taux de biomasse optimal prédit est de 4,98 g d'atomes de carbone pour 10 moles de méthanol, 4,77 g d'atomes de carbone pour 10 moles de pyruvate et de 4,73 g d'atomes de carbone pour 10 moles de succinate. L'analyse prédit également que le facteur limitant de la croissance sur méthanol sera la disponibilité des nucléotides générés par le métabolisme, alors que le facteur limitant de la croissance sur des molécules multi-carbonées sera la production d'énergie due au fort rendement du cycle TCA (Van Dien and Lidstrom, 2002).

(iv) Multi-consommation de molécules de carbone.

Comme vu dans le paragraphe précédent, la croissance de *M. extorquens* semble être la plus efficace en présence de méthanol. Cependant, ce micro-organisme est capable d'assimiler en même temps différentes sources de carbone et de les incorporer au métabolisme. Des molécules de méthanol et de succinate ont été marquées au carbone 13 avant d'être assimilées par une culture de *M. extorquens*. Les analyses par spectrométrie de masse du lysat cellulaire montrent que le carbone du méthanol va être assimilé par le cycle de la sérine et va alimenter la gluconéogenèse et la voie des pentoses phosphate sans alimenter la fin du cycle de la sérine. Cependant, l'alimentation du cycle TCA ainsi que la

production de glycine ne va se faire que par les carbones du succinate (voir **figure 31**). Le succinate va également être utilisé afin d'alimenter la gluconéogenèse et la voie des pentoses phosphate. Ces résultats montrent qu'en présence de méthanol et de succinate (ou d'autres molécules 3 ou 4C), le rôle principal du méthanol est d'être oxydé en CO₂ afin de produire l'énergie nécessaire pour la croissance de la bactérie. De ce fait, les molécules de succinate vont servir à alimenter les voies métaboliques permettant la génération de biomasse (Peyraud *et al.*, 2012). Ces découvertes montrent que *M. extorquens* peut moduler son métabolisme afin d'en tirer le meilleur rendement possible. Cela suggère que le rendement de son métabolisme peut être amélioré selon les molécules présentes dans son environnement, par complémentation d'un milieu de culture par exemple. Il existe peu d'études de ce genre sur l'effet de l'assimilation de plusieurs sources de carbone, indiquant qu'il existe peut-être des combinaisons de sources de carbone plus efficaces que d'autres pour sa croissance.

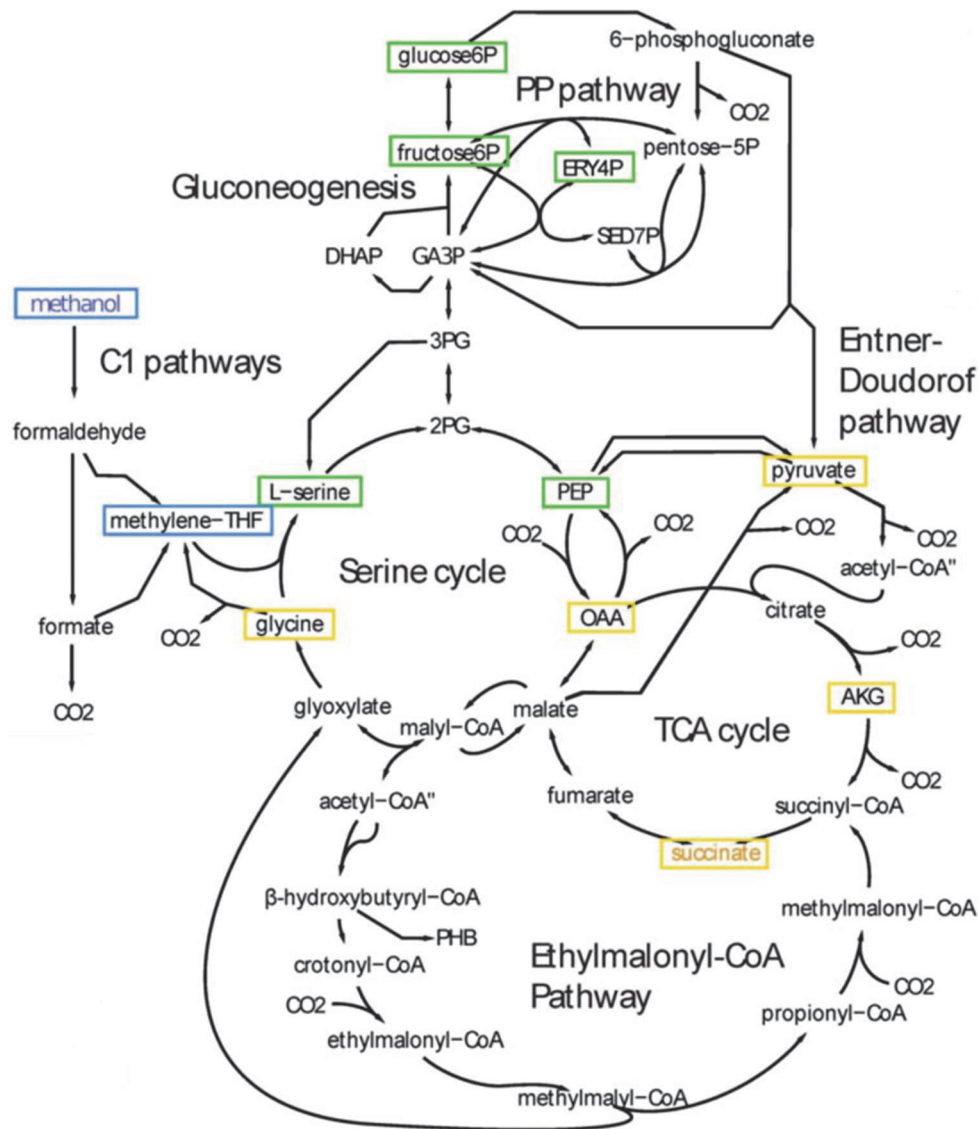


Figure 31: Co-assimilation de méthanol et de succinate dans le métabolisme central de *M. extorquens*. Les métabolites ayant incorporés le carbone provenant du succinate sont encadrés en jaune, en bleu pour le méthanol et en vert pour les deux molécules (Peyraud *et al.*, 2012).

c. Plasticité du métabolisme

Les exemples expliqués ci-dessus montrent la grande adaptabilité que *M. extorquens* a développée afin de s'adapter aux différentes sources de carbone retrouvées dans son environnement. Il peut ainsi croître en utilisant des molécules à un carbone, plusieurs carbones voir même utiliser différentes sources de carbone en même temps. *M. extorquens* n'est pas connu pour métaboliser des sucres à 6 carbones comme le glucose. D'après des analyses génomiques, Il semblerait que son métabolisme peut assimiler des molécules à 5C

comme le L-Lyxose ou le D-ribose. Il serait intéressant de compléter ces molécules à d'autres sources de carbone afin de voir si leur assimilation aurait un impact sur les voies de la gluconéogenèse.

Néanmoins, ce micro-organisme peut perdre cette faculté d'adaptation à son environnement. En effet, de nombreux gènes sont essentiels pour assurer la méthylothrophie (Peyraud *et al.*, 2011). Cela signifie que des mutations peuvent faire disparaître la méthylothrophie chez *M. extorquens*. Il a également été démontré que cette bactérie pouvait perdre cette faculté si elle n'était plus cultivée avec des molécules 1C. En effet, une colonie de *M. extorquens* a été repiquée sur un milieu ayant du succinate comme seule source de carbone. Après 1500 repiquages, la souche était incapable de se développer avec des molécules 1C comme le méthanol, la méthylamine ou le formate (Lee *et al.*, 2009). Cela met en évidence la versatilité de cette espèce et peut expliquer en partie la difficulté de faire croître cette bactérie de manière reproductible en laboratoire.

Les bactéries méthylothrophes sont des contaminants fréquents des systèmes d'eau des industries. Même si ces bactéries peuvent se développer en milieu très pauvre, il est fort probable qu'elles aient recourt à des mécanismes de protection qu'elles ne pourraient élaborées seules. Les interactions entre les différentes espèces sont de plus en plus étudiées car elles favoriseraient la survie en milieu hostile. Le paragraphe suivant est consacré à quelques interactions intervenant dans ces communautés de micro-organismes.

IV. Biofilm et interactions bactériennes

Comme discuté dans la première partie de l'introduction, les entreprises pharmaceutiques et cosmétiques utilisent de l'eau ultra-pure pour la fabrication de leurs produits. Cette eau subit un certain nombre de traitements physico-chimiques extrêmement drastiques, comme les ultra-violets, l'osmose inverse et différentes étapes de filtrations. Un exemple de purification d'eau utilisé dans l'industrie pharmaceutique est représenté **figure 32**.

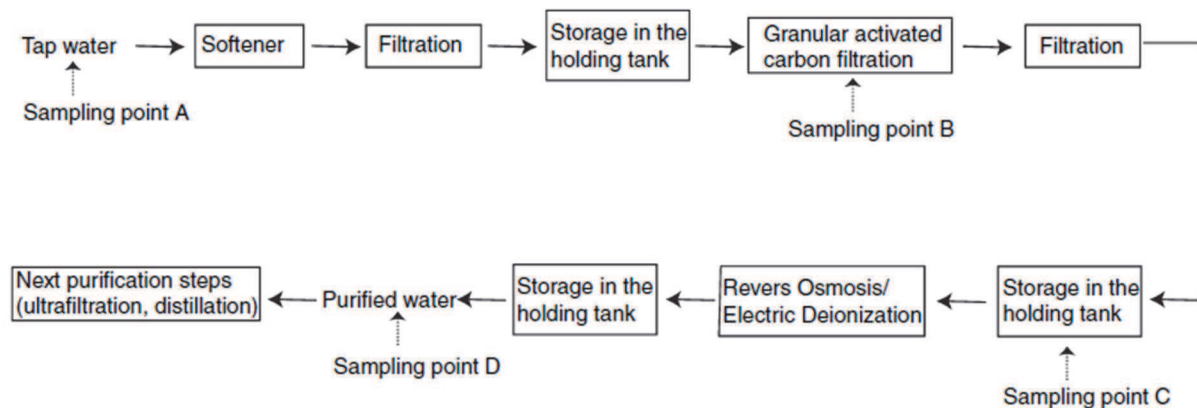


Figure 32 : Exemple d'un système de purification de l'eau utilisé dans le milieu pharmaceutique. Des prélèvements pour analyses sont effectués à différents endroits du circuit de manière régulière (Kawai *et al.*, 2004). Les points A, B, C et D représentent les points de prélèvements des échantillons (voir page suivante).

Ce système possède plusieurs modules de filtrations séparés par d'autres méthodes de purifications. Malgré l'amélioration perpétuelle des techniques de décontamination, les micro-organismes réussissent à s'adapter à ces conditions drastiques. Ces contaminants représentent des pertes qui peuvent être conséquentes pour les industries car leur présence entraîne la destruction du produit fini. Il est donc capital d'étudier et comprendre comment ces micro-organismes survivent dans ces environnements qui sont, de plus, très pauvres en nutriments. Les études sur ce sujet commencent à prendre de l'ampleur et ont déjà permis d'obtenir des informations intéressantes sur la nature de ces contaminants, et les moyens mis en œuvre pour leur survie.

a) Communautés bactériennes retrouvées dans les eaux industrielles

Il est assez difficile de se faire une idée précise de la diversité des contaminants retrouvés dans l'industrie car peu de données sont disponibles. Kawai et ses collaborateurs ont analysés 21 échantillons d'un circuit d'eau industrielle prélevés dans l'intervalle d'une année (Kawai *et al.*, 2004). L'analyse des séquences d'ARN ribosomique 16S extrait des échantillons a permis d'identifier les micro-organismes présents dans ces échantillons. Les clones détectés sont représentés sur l'arbre phylogénétique (**figure 33**) qui a été généré afin de permettre leur identification. Cet arbre donne un aperçu de la diversité des micro-organismes retrouvée.

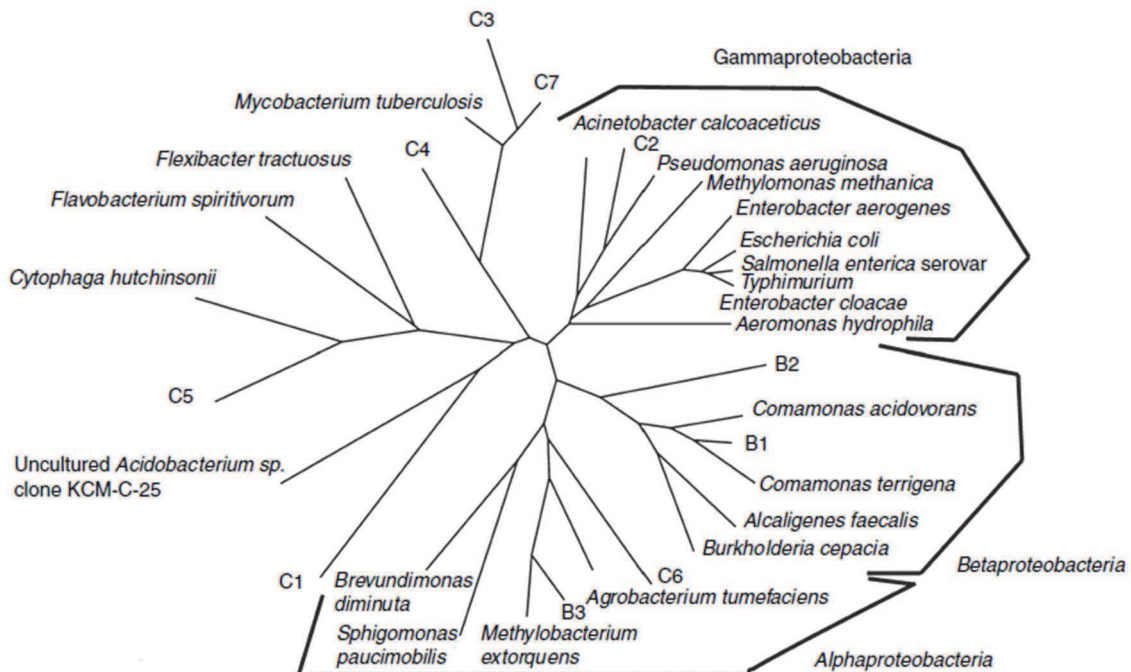


Figure 33: arbre phylogénétique permettant l'identification des clones retrouvés dans un circuit d'eau ultrapure (Kawai *et al.*, 2004). Les clones B1 à B3 et C1 à C7 correspondent à leur endroit de prélèvement (voir **Figure 32**).

Les clones identifiés sont au nombre de 10. Dans la zone de filtration au charbon actif (zone B, **Figure 32**), la présence d'*Aquaspirillum sp.* (B1) et *Methylobacterium sp.* (B3) a été observée. Le clone B2 n'a pas été identifié mais appartenant au groupe des beta-protéobactéries. Dans le réservoir de stockage (zone C, **Figure 32**), *Cellvibrio sp.* et plusieurs bactéries du genre *Mycobacterium* ont été détectées. Ces résultats indiquent que les systèmes d'eau pharmaceutiques peuvent être contaminés par des micro-organismes phylogénétiquement très variés. D'autres études du même type ont montrées que de nombreuses espèces de

Sphingomonas, de *firmicutes* et de *Ralstonia* étaient présentes dans ces systèmes de purification d'eau (Bereschenko *et al.*, 2008; Kulakov *et al.*, 2002). Les mécanismes de résistance de ces micro-organismes permettant de résister aux méthodes de décontaminations ainsi qu'à la très faible quantité de nutriments présente dans ces circuits d'eau sont encore peu connus. La formation de biofilm par ces micro-organismes semble être leur principale protection (Bereschenko *et al.*, 2008; Kulakov *et al.*, 2002). Un biofilm est une communauté interactive de micro-organismes qui sont associés à une surface et contenus dans une matrice extracellulaire (Monds and O'Toole, 2009).

b) *Les différentes étapes de la formation d'un biofilm*

Les biofilms peuvent être retrouvés dans tous les environnements, mais ont majoritairement été mis en évidence et étudiés en milieu hospitalier (Flemming and Wingender, 2001; Smith and Hunter, 2008) mais également à l'intérieur du corps humain, notamment sur la dentition (Jefferson, 2004). L'avantage pour les micro-organismes de former un biofilm réside dans la résistance de cette structure aux nombreux stress, tels les ultra-violets, les variations de pH, la dessiccations ainsi que les antibiotiques (Chang *et al.*, 2007; Davey and O'toole, 2000; Elasri and Miller, 1999; Stewart and William Costerton, 2001).

Jusque dans les années 1990, la communauté scientifique pensait que les bactéries adhéraient aux surfaces à cause des contraintes environnementales et non par adaptation au milieu. Il faut attendre des études sur *Myxococcus xanthus* pour s'apercevoir que cette bactérie pouvait s'adapter à son environnement devenant pauvre en nutriments en formant de manière spontanée deux types cellulaires : un type cellulaire végétatif se fixant sur un support (environnement ou milieu de culture) et un deuxième type cellulaire sous formes de myxospores pouvant être disséminé. Cette différenciation permet aux bactéries de résister à l'appauvrissement du milieu et coloniser de nouveaux environnements (Søgaard-Andersen *et al.*, 2003). Depuis, de nombreuses recherches sur les biofilms ont permis de comprendre certains points clés de la vie d'un biofilm.

La formation d'un biofilm peut se diviser en 5 étapes (Stoodley *et al.*, 2002) comme le montre la **figure 34** : 1) les cellules planctoniques vont s'attacher de manière réversible ou non à la surface 2) si la cellule reste attachée, elle va produire des exopolysaccharides (EPS) rendant sa fixation irréversible 3) suit la première étape du développement du biofilm au cours de laquelle, les cellules commencent à se multiplier 4) on observe ensuite la maturation de l'architecture du biofilm, formant une macro-colonie 5) puis la dispersion des cellules du biofilm permettant la colonisation de nouveaux environnements.

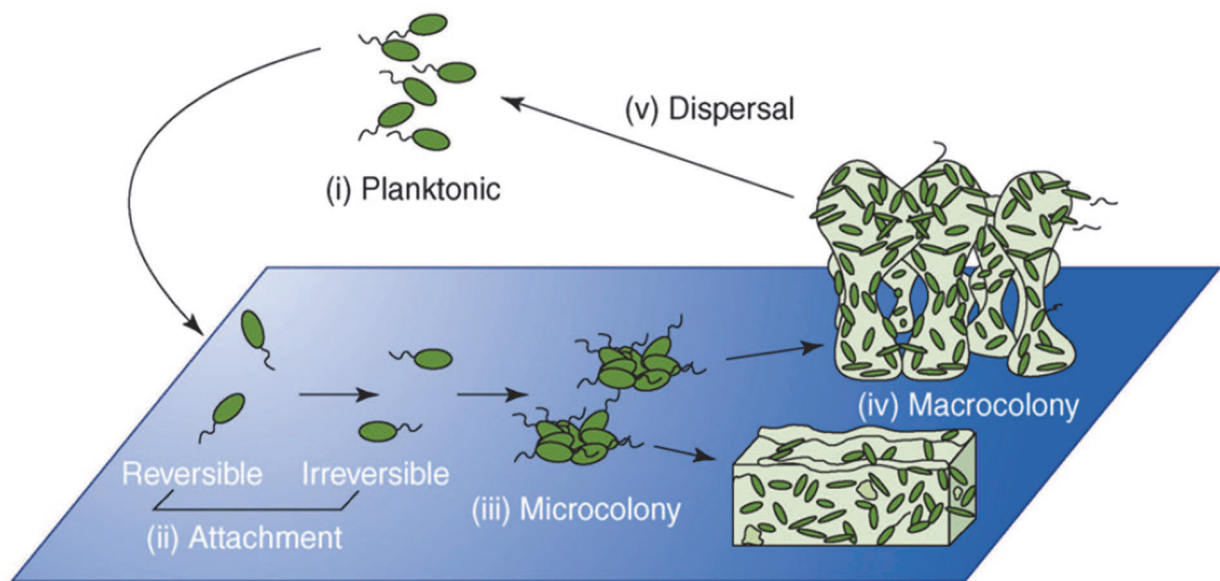


Figure 34 : Les cinq étapes de formation d'un biofilm (Monds and O'Toole, 2009).

1) L'adhésion des cellules

La première étape de la formation d'un biofilm est l'adhésion cellulaire à une surface plus ou moins rigide. Si le milieu est liquide, la bactérie va nager grâce à ses flagelles. Le terme de swimming est alors employé. Si la bactérie se déplace à la surface d'un milieu solide à l'aide de ses flagelles, on parle dans ce cas de swarming (Fraser and Hughes, 1999). Lors de la phase d'adhésion, Les pili polaires ainsi que les flagelles vont toucher la surface (mechanosensing) et ainsi inhiber la rotation des flagelles (Belas, 2014). A ce moment, la bactérie va synthétiser des EPS ainsi que des protéines fixatrices rendant la fixation irréversible. La cellule devient alors sessile. Il existerait plusieurs types de protéines fixatrices. L'une des premières identifiées a été découverte chez *Pseudomonas fluorescens*. Son adhésion à la surface est due à une adhésine appelée LapA (Hinsa *et al.*, 2003).

2) Formation des macro-colonies.

La composition et la structure du biofilm varient en fonction des espèces qui le constituent. La matrice d'un biofilm est essentiellement composée d'exopolysaccharides mais également de protéines servant à la structure, d'ADN, de lipides et d'autres constituants cellulaires comme les pili (Clark *et al.*, 2007). Cet assemblage final va permettre la protection des cellules contre les stress de l'environnement. De ce fait, certains scientifiques parlent de « sociobiologie » car les cellules interagissent et suivent la même évolution sociale. Cependant, cette coopération peut parfois se transformer en compétition montrant ainsi que les biofilms sont des communautés microbiennes à part entière (Elias and Banin, 2012; Nadell *et al.*, 2009).

3) Dispersion des cellules du biofilm

La dispersion cellulaire permet la colonisation de nouveaux environnements. Le détachement des cellules peut être fait de manière passive, causée par la force des flux mais également de manière active par lyse de la matrice d'exopolymères lors de la diminution des nutriments par exemple. Cela peut être généré par le quorum sensing (voir prochaine section) ou d'autres facteurs comme la production de surfactants qui diminue la surface d'adhésion du biofilm (Karatan and Watnick, 2009).

c) *Les interactions intra/inter espèces*

Les interactions et la communication entre les micro-organismes jouent un rôle important dans la formation d'un biofilm. Elles permettent la motilité de certaines espèces aboutissant à la colonisation de nouveaux milieux. La communication permet de synchroniser le mouvement des cellules lors de la formation du biofilm. Elle induit également la phase de dissémination. Le quorum sensing (QS) est le mode de communication entre les bactéries le mieux étudié. Ces différents points sont développés par la suite.

1) Interactions induites par le quorum sensing

Le quorum sensing est défini comme étant un mécanisme qui implique la synthèse, la libération et la détection de molécules de signalisation appelées autoinducteurs (AIs) (Fuqua *et al.*, 1994). Il permet aux bactéries d'évaluer la densité de population en mesurant l'accumulation de molécules spécifiques de signalisation sécrétées par d'autres membres de la communauté (Solano *et al.*, 2014). Il existe plusieurs types de molécules permettant la communication : les acyl homosérines lactones (AHLs) (retrouvés chez les bactéries à Gram négatif), les furanosyl borate diesters (AI2), les acides gras cis-insaturés et de petits peptides (retrouvés chez les bactéries à Gram positif). Le QS est le plus souvent intra-espèce mais il peut être inter-espèces si les molécules de communication sont homologues (Michael *et al.*, 2001).

Le rôle du quorum sensing dans les différentes étapes de formation du biofilm n'est pas encore totalement élucidé. Des études antérieures ont montré que le QS avait un rôle primordial lors de la formation du biofilm induisant la sécrétion d'exopolysaccharides (Sakuragi and Kolter, 2007). Cependant, ces résultats ont été remis en question en 2009 par (Ueda and Wood, 2009) indiquant que le QS, au contraire, inhiberait la synthèse d'exopolysaccharides et induirait d'autres facteurs favorisant la dispersion du biofilm.

2) Influence lors de la formation du biofilm

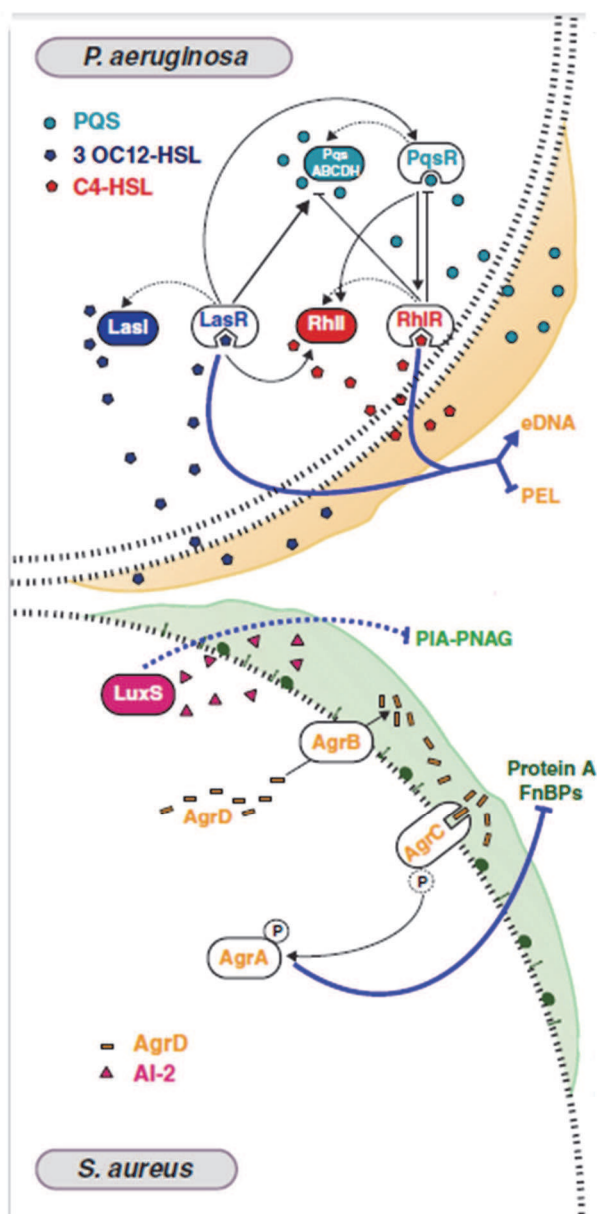
Lors de la formation du biofilm, le QS semblerait plutôt influencer la motilité des bactéries, plus exactement le swarming. Les cellules se différencient et deviennent allongées ainsi qu'hyper flagellées. Les cellules vont également produire un agent surfactant, c'est-à-dire un agent mouillant réduisant les tensions de surface souvent sous forme de mucus visqueux (Daniels *et al.*, 2004; Verstraeten *et al.*, 2008). Un milieu semi solide à solide de 0,5 à 2% d'agar permet de visualiser le swarming.

P. aeruginosa synthétise des rhamnolipides (agent surfactant) selon la concentration d'AHL dans le milieu (Pearson *et al.*, 1997). Le même principe a été observé pour *Serratia marcescens* et *Bacillus subtilis* qui produisent leurs surfactants en fonction de la concentration des molécules du QS (Verstraeten *et al.*, 2008). Chez *Rhizobium etli*, les AHL vont avoir deux fonctions, l'une étant la production de surfactants, l'autre étant de jouer le rôle de surfactant,

réduisant eux-mêmes les tensions de surface (Daniels *et al.*, 2006). Ces quelques exemples montrent l'importance des molécules de signalisation afin de coloniser de nouveaux environnements, étape préalable à la formation de biofilms.

3) Rôle dans la dissémination

Le QS aurait également un rôle important dans la dissémination du biofilm. Selon les espèces, les mécanismes peuvent être très différents. Pour exemple, la **figure 35** présente le QS connu actuellement de deux bactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* lors de leur présence dans un biofilm. *P. aeruginosa* sécrète deux acyl homosérines lactones; 3 OC12-HSL et C4-HSL; ainsi qu'une quinolone de signal (PQS). Ces molécules sont



respectivement codées par les gènes *lasI*, *rhII* et *pqsAB*. Les facteurs de transcription LasR, RhIR et PqsR vont détecter la présence de leur propre molécule signal ainsi que celles de la communauté permettant une autorégulation. Ces facteurs de transcriptions vont inhiber la production d'exopolysaccharides (PEL). De ce fait, la structure du biofilm sera moins rigide, favorisant la dissémination des cellules.

Figure 35 : Quorum sensing de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Les molécules du QS vont principalement favoriser des mécanismes permettant la lyse du biofilm (Solano *et al.*, 2014).

Notons que ces facteurs peuvent également induire la transcription de gènes permettant la synthèse d'ADN (eDNA) extracellulaire intervenant dans la structuration du biofilm.

S. aureus, quant à lui, utilise un QS assez différent. Il synthétise d'abord un précurseur (AgrD) qui va être excrété hors de la cellule par AgrB. Le précurseur va être reconnu par l'histidine kinase AgrC. Cette dernière va phosphoryler AgrA qui alors va inhiber l'expression des protéines A et FnBPs qui sont utilisées dans la structure de la matrice du biofilm. De plus, *S. aureus* sécrète par un mécanisme encore inconnu un IA-2 qui va inhiber la synthèse d'exopolysaccharides (voir **figure 35**) (Solano *et al.*, 2014). Ces exemples indiquent que le QS est un mode de communication complexe loin d'être totalement élucidé. Les connaissances actuelles suggèrent que le QS pourrait être utilisé essentiellement pour la phase de dispersion du biofilm.

d) *Autres types d'interactions simples*

Le quorum sensing n'est pas le seul moyen permettant l'interaction des bactéries afin d'initier la formation d'un biofilm ou coloniser de nouveaux environnements. En effet, d'autres molécules différentes des AHL peuvent influencer le swarming.

1) Interactions moléculaires

Chez *Proteus mirabilis*, Sturgill et Rather ont montré que de la putrescine extracellulaire, molécule résultant de la dégradation d'acides aminés, induit la différenciation des cellules afin de faire du swarming (Sturgill and Rather, 2004). Une étude très récente a également montré que *Xanthomonas perforans* pouvait induire et favoriser le swarming de *Paenibacillus vortex* par une ou plusieurs molécules volatiles non identifiées (Hagai *et al.*, 2014). Si les deux espèces sont déposées à la surface d'une gélose, le swarming de *P. vortex* va être dirigé vers *X. perforans* par rapport au swarming diffus obtenu lorsque la bactérie est seule. La même attraction est observée si une bandelette de plastique sépare les deux espèces, suggérant que l'interaction est due à des molécules volatiles. De plus, la présence de *X. perforans* peut redonner la motilité à *P.vortex* perdue au cours des repiquages subis en laboratoire. Cela montre que des facteurs externes peuvent influencer le phénotype de *P. vortex*.

2) Interactions physiques : swarming et « hitchhiking »

L'interaction entre les micro-organismes permettant la colonisation de nouveaux environnements peut être également physique. Le swarming de *P. vortex*, vu précédemment, peut par exemple, permettre le déplacement des spores (hitchhiking) d'*Aspergillus fumigatus* (Ingham *et al.*, 2011). *P. vortex* trouverait un avantage en utilisant le mycélium d'*A. fumigatus* pour accéder à des environnements difficiles d'accès. Ce type d'interactions peut également avoir un impact sur le métabolisme des deux membres de la coopération. Si *B. subtilis* et *Aspergillus Brasiliensis* sont cultivés ensemble sur boîte de Petri, *B. subtilis* s'attache aux hyphes du champignon si ces derniers pénètrent dans l'agar afin de profiter de conditions anaérobies. Il a été montré que lors de cette interaction, les deux organismes modifient leur métabolisme afin de ne plus produire de molécules antimicrobiennes ou antifongiques (Benoit *et al.*, 2014).

e) Interactions synergiques

Les interactions entre plusieurs souches au sein d'un biofilm sont difficiles à étudier et peu connues hormis celles vues précédemment. Il a été démontré que la génération de biofilm était influencée selon la nature des espèces présentes sans pouvoir l'expliquer. Par exemple, le biofilm généré par *Fusobacterium nucleatum* est considérablement augmenté en présence de *Porphyromona gingivalis* (Saito *et al.*, 2008), même si cette dernière ne produit pas d'IA2 (mutation dans le gène d'intérêt). Ren et son équipe (2014) ont étudié la formation de biofilms par quatre souches environnementales différentes. Ils ont démontré que mises ensemble, la biomasse du biofilm était augmentée de 63 % par rapport aux biofilms cumulés des espèces seules. Ces résultats ne sont obtenus qu'en présence des quatre espèces, montrant l'importance de chaque souche. *Xanthomonas rétroflexes* est majoritairement retrouvée dans le biofilm, indiquant sa capacité à générer du biofilm augmentée par l'influence des trois autres espèces (Ren *et al.*, 2014). Les auteurs expliquent cette coopération par « l'hypothèse de la Reine Noire » qui veut que la coopération est la conséquence de l'adaptation d'une espèce à la présence des autres. Les bactéries vont majoritairement utiliser les voies

métabolomiques ou les fonctions produites par les bactéries environnantes (Morris *et al.*, 2012).

Les biofilms présents dans les systèmes d'eau sont encore peu étudiés car les espèces microbiennes les constituants sont variables. L'étude de biofilms de souches potentiellement retrouvées dans l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire représente un intérêt dans la compréhension voire la découverte de mécanismes de communication au sein des biofilms. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la formation de ces biofilms peut également aider à la compréhension du développement de ces organismes qui sont parfois difficiles à cultiver en laboratoire. Cela peut-être une source potentielle d'indices pour la complémentation de milieu de culture permettant de reproduire certains types de communication afin d'améliorer la croissance de ces micro-organismes. En sens inverse, ces connaissances pourraient également être utilisées pour améliorer les systèmes de traitement d'eaux pour l'obtention d'eau ultra pure.

PARTIE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

II. Matériels et méthodes

A. Préparation et évaluation des milieux synthétiques

Les milieux synthétiques préparés sont transvasés dans des bouteilles de 100 ml puis inoculés et incubés à différentes températures selon les milieux. Les performances des milieux sont évaluées soit par détection visuelle de la croissance microbienne, soit par prise de densité optique (DO). Ces performances sont comparées aux performances de milieux complexes.

I. Micro-organismes utilisés lors des expériences

Les micro-organismes, utilisés pour l'évaluation des milieux de culture, proviennent soit de la collection ATCC soit sont de souches isolées de systèmes industriels de production d'eau. Ces dernières sont notées « souches sauvages ». Ces bactéries sont conservées en cryotubes et maintenues en état de latence à -80°C dans une solution de glycérol 10% et d'HEPES 1 mM. Les milieux à évaluer sontensemencés de manière à obtenir une concentration initiale allant de 200 à 400 UFC/L par souche. Pour ce faire, des dilutions en cascade au dixième sont réalisées dans de l'eau peptonée (1800M - Fisher Scientific Bioblock) à partir du cryotube de la souche à inoculer.

a) *Micro-organismes aérobies*

Souche	Provenance
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Candida albicans</i>	DSM 1386
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Methylobacterium extorquens</i>	ATCC 43645
<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	souche sauvage
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	ATCC 29983
<i>Paenibacillus lautus</i>	souche sauvage
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
<i>Ralstonia pickettii</i>	ATCC 27511
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228

Les micro-organismes sont incubés à $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans des bouteilles contenant 100 ml de milieu stérile. La détection visuelle d'un trouble dans le milieu ou de l'apparition d'un biofilm atteste de la croissance des micro-organismes. Le nombre de cellules inoculées est vérifié par étalement des dilutions sur un milieu complexe solide approprié. *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli*, *P. lautus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. epidermidis* sont étalés sur milieu Trypcase Soy Agar (TSA). *M. extorquens*, *M. fujisawaense*, *M. mesophilicum* et *R. pickettii* sont étalés sur milieu R2A. *A. brasiliensis* est étalé sur milieu Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Tous les tests sont réalisés en triplicata.

b) *Micro-organismes anaérobies*

Souche	Provenance
<i>Bacteroides vulgatus</i>	ATCC 8482
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC 19404
<i>Propionibacterium acnes</i>	ATCC 6919

Ces micro-organismes sont incubés à $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sous atmosphère azotée. Cette atmosphère est créée par injection d'azote (N_2) dans des bouteilles fermées par un septum et contenant 100 ml de milieu de culture synthétique anaérobie (MSana) stérile à l'aide d'une aiguille de 0,8 x 40 mm (NN-2138R – Terumo). Une seconde aiguille est plantée dans le septum pour permettre la sortie de l'air pendant l'ajout d'azote. Le nombre de cellules inoculées est vérifié par étalement des dilutions sur milieu complexe Columbia au sang (COS).

II. Milieux de culture utilisés

Milieux solides:

- Trypcase Soy Agar (43011 - Biomérieux) : Peptone de caséine : 17 g /L ; Peptone de soja : 3g/L ; Chlorure de sodium : 5 g/L ; Dextrose : 2,5 g/L ; Dipotassium phosphate : 2,5 g/L ; Agar : 15 g/L.
- Sabouraud Dextrose Agar (43555 - Biomérieux) : Protéose peptone : 10 g/L ; Dextrose : 40 g/L ; Agar : 15 g/L.
- Reasoner's 2 Agar (43551 - Biomérieux) : Protéose peptone : 0,5 g/L ; Peptone de caséine : 0,5 g/L ; Extraits de levure : 0,5 g/L ; Dextrose : 0,5g/L ; Dipotassium phosphate 0,3 : g/L ; Sulfate de magnésium 0,05 : g/L ; Pyruvate de sodium 0,3 : g/L ; Agar : 15 g/L.
- Columbia + 5% de sang de mouton (43041 - Biomérieux) : Peptone de caséine et de viande : 10 g/L ; Hydrolysate de protéines animales : 10 g/L ; Peptone de cœur : 3 g/L ; Amidon de maïs : 1 g/L ; Chlorure de sodium : 5 g/L ; Agar : 13,5 g/L ; Sang (mouton) 50ml/L.

Milieux liquides:

- Trypcase Soy Broth (STBMSTB12 - Merck Millipore) : idem Trypcase Soy Agar sans agar.
- Fluid Thioglycollate Medium (STBMFTM12 - Merck Millipore) : Peptone de caséine : 15 g/L ; Extraits de levure : 5 g/L ; Chlorure de sodium : 2,5 g/L ; Dextrose : 5,5 g/L ; Thioglycollate de sodium : 2 ,5 g/L ; L-cystine : 0,5 g/L ; Résazurine : 0,001 g/L ; Agar : 0,75g/L.

III. Préparation des milieux de culture synthétiques

Deux sortes de milieux de culture synthétiques sont réalisées, un milieu aérobie (MSaé) et un milieu anaérobie (MSana). Afin de simplifier la préparation des milieux, les composants sont regroupés en différentes familles et préparés en solutions mères comme indiqué ci-après.

a) *Protocole du milieu synthétique MSaé*

La réalisation du milieu synthétique se fait à partir du mélange de différentes solutions mères de composés. Les concentrations indiquées sont les concentrations pour un litre de milieu final. Les solutions mères sont mélangées pour un volume final de 900 ml de telle manière à pouvoir ajuster le pH puis QSP 1L.

1) Les acides aminés

Les acides aminés sont soit dissous dans de l'eau MilliQ soit dans de l'acide chlorhydrique 3N (CL05.0315.1000 – Fischer). Les acides aminés se dissolvant dans l'eau sont ajoutés dans une même solution mère d'eau MilliQ :

Acide aminé	Concentration finale	Référence
DL-Alanine	100 mg/L	Sigma A7502
L-Arginine	1 g/L	Sigma A5006
Glycine	100 mg/L	Sigma 50046
L-Histidine	50 mg/L	Sigma H8000
L-Hydroxy-proline	40 mg/L	Sigma 56250
L-Isoleucine	100 mg/L	Sigma I2752
L-Lysine	100 mg/L	Sigma L5501
L-Leucine	100 mg/L	Sigma 61819
DL-Methionine	70 mg/L	Sigma M9500
L-Proline	50 mg/L	Sigma 81709
DL-Phenylalanine	100 mg/L	Sigma 147966
DL-Serine	150 mg/L	Sigma S4375
DL-Threonine	100 mg/L	Sigma T1520
DL-Valine	100 mg/L	Sigma 94640

Les acides aminés ne se dissolvant pas dans l'eau sont préparés dans une solution d'HCl 3N à 10 % (vol/vol) et chauffée à 60 °C jusqu'à parfaite dissolution.

Acide aminé	Concentration finale	Référence
L-Acide aspartique	100 mg/L	Sigma A9256
L-Acide glutamique	200 mg/L	Sigma 49449
L-Tryptophane	50 mg/L	Sigma 93659
L-Tyrosine	50 mg/L	Sigma 93829
L-Cystine	80 mg/L	Fluka 30200

2) Les bases azotées

Chaque solution de base azotée est préparée sous forme de solution mère :

Base azoté	Concentration de chaque solution mère	Référence
Adénine	100 mg dans 10ml d'une solution d'HCl 3N à 2% (vol/vol)	Sigma A8626
Guanine	100 mg dans 10ml d'une solution d'HCl 3N à 40% (vol/vol)	Sigma G11950
Uracile	100 mg dans d'une solution de NaOH 1N à 2% (vol/vol)	Sigma U0750
Thymine	100 mg dans d'une solution NaOH 1N à 2% (vol/vol)	Sigma T0376
Xanthine	100 mg dans d'une solution NaOH 1N à 20% (vol/vol)	Sigma X4002
Cytosine	100 mg dans 10 ml d'eau MilliQ	Sigma C3506

Les solutions mères sont chauffées à 60 °C avec agitation pendant 30 minutes excepté pour la cytosine. La concentration finale de chaque base azotée dans le milieu est de 5mg/L.

3) Les oligo-éléments

Chaque oligo-élément a sa propre solution mère de 100mg/L d'eau MilliQ :

Oligo-élément	Concentration finale	Référence
$\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	Sigma M3634
CoCl_2	10 $\mu\text{g/L}$	Sigma 60818
$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	Sigma M3634
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/L	Sigma 215422
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	VWR 23093.233
$\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	Merck 1.06727.0100
ZnCl_2	1 mg/L	Sigma 31439

4) Autres constituants

Les autres constituants sont préparés dans une solution mère d'eau MilliQ :

Molécule	Concentration finale	Référence
NaCl	1,66 g/L	Sigma 71376
K_2HPO_4	830 mg/L	Sigma P9666
Dextrose	830 mg/L	Sigma D9434
Pyruvate	500 mg/L	Sigma P2256
KH_2PO_4	330 mg/L	Sigma P9791
NH_4Cl	330 mg/L	Sigma 326372
Bétaine	100 mg/L	Sigma B2629
Acide oléique	20 mg/L	Sigma O1257
MgSO_4	33 mg/L	Sigma M7506
CaCl_2	6.6 mg/L	Sigma C4901

5) Les vitamines

Chaque vitamine a sa propre solution mère à 10g/L :

Vitamine	Concentration finale	Solvant	Référence
Acide ascorbique	1,7 mg/L	H ₂ O	Sigma A5960
Acide D-panthothanique	2,8 mg/L	H ₂ O	Sigma P2250
Acide 4-Aminobenzoïque	1,7 mg/L	Ethanol 70%	Sigma A9878
Acide folique	100 µg/L	NaOH 1N	Sigma F7876
Biotine	50 µg/L	NaOH 0,1N	Sigma B4501
Cobalamine	2,6 mg/L	H ₂ O	Sigma V2876
Nicotinamide	5,6 mg/L	H ₂ O	Sigma N3376
Pyridoxine hydrochloride	900 µg/L	H ₂ O	Sigma P9755
Pyridoxal hydrochloride	900 µg/L	H ₂ O	Sigma P9130
Pyridoxamine dihydrochloride	900 µg/L	H ₂ O	Sigma P9380
Phylloquinone	1,7 mg/L	Acétone	Sigma 95271
Riboflavine	1 mg/L	NaOH 1N	Sigma R4500
Thiamine hydrochloride	300 µg/L	H ₂ O	Sigma T4625

6) Finalisation du milieu

Les différentes solutions mères sont mélangées ensemble pour un volume de 900 ml puis le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$ avec de l'HCl ou du NaOH pour diminuer ou pour augmenter respectivement le pH. Le milieu est ensuite complété d'eau MilliQ pour obtenir un volume final d'un litre. Enfin, le milieu est stérilisé par filtration à l'aide d'un « Stericup » d'un litre de porosité 0,25µm (SCGPU11RE – Merck Millipore).

Référence des solvants :

NaOH 1N	Sigma: S2567
HCl 3N	Fischer: CL05.0315.1000
Acétone	Fischer: A1050
Ethanol 70%	Sigma: 02877

b) *Protocole du milieu synthétique MSana*

Seules les concentrations des **acides aminés** et la composition des **autres constituants** changent par rapport au milieu MSaé.

1) Les acides aminés :

Les acides aminés se dissolvant dans l'eau sont ajoutés dans une même solution mère d'eau MilliQ.

Acide aminé	Concentration finale	Référence
DL-Alanine	500 mg/L	Sigma A7502
L-Arginine	5 g/L	Sigma A5006
Glycine	500 mg/L	Sigma 50046
L-Histidine	250 mg/L	Sigma H8000
L-Hydroxy-proline	200 mg/L	Sigma 56250
L-Isoleucine	500 mg/L	Sigma I2752
L-Lysine	500 mg/L	Sigma L5501
L-Leucine	500 mg/L	Sigma 61819
DL-Methionine	350 mg /L	Sigma M9500
L-Proline	250 mg/L	Sigma 81709
DL-Phenylalanine	500 mg/L	Sigma 147966
DL-Serine	750 mg/L	Sigma S4375
DL-Threonine	500 mg/L	Sigma T1520
DL-Valine	375 mg/L	Sigma 94640

Les acides aminés ne se dissolvant pas dans l'eau sont préparés dans une solution d'HCl 3N à 10 % (vol/vol) et chauffée à 60 °C jusqu'à parfaite dissolution.

Acide aminé	Concentration finale	Concentration de la solution mère	Référence
L-Acide aspartique	500 mg/L	1,5 g/600 ml	Sigma A9256
L-Acide glutamique	1 g/L	3 g/600 ml	Sigma 49449
L-Tryptophane	250 mg/L	750 mg/600 ml	Sigma 93659
L-Tyrosine	250 mg/L	750 mg/600 ml	Sigma 93829
L-Cystine	400 mg/L	1,2 g/600 ml	Fluka 30200

2) Les bases azotées

Chaque solution de base azotée est préparée sous forme de solution mère :

Base azoté	Concentration de chaque solution mère	Référence
Adénine	100 mg dans 10ml d'une solution d'HCl 3N à 2% (vol/vol)	Sigma A8626
Guanine	100 mg dans 10ml d'une solution d'HCl 3N à 40% (vol/vol)	Sigma G11950
Uracile	100 mg dans d'une solution de NaOH 1N à 2% (vol/vol)	Sigma U0750
Thymine	100 mg dans d'une solution NaOH 1N à 2% (vol/vol)	Sigma T0376
Xanthine	100 mg dans d'une solution NaOH 1N à 20% (vol/vol)	Sigma X4002
Cytosine	100 mg dans 10 ml d'eau MilliQ	Sigma C3506

Les solutions mères sont chauffées à 60 °C avec agitation pendant 30 minutes excepté pour la cytosine. La concentration finale de chaque base azotée dans le milieu est de 5mg/L.

3) Les oligo-éléments

Chaque oligo-élément a sa propre solution mère de 100mg/L d'eau MilliQ :

Oligo-élément	Concentration finale	Référence
$\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	Sigma M3634
CoCl_2	10 $\mu\text{g/L}$	Sigma 60818
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	Sigma M3634
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg/L	Sigma 215422
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	VWR 23093.233
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 $\mu\text{g/L}$	Merck 1.06727.0100
ZnCl_2	1 mg/L	Sigma 31439

4) Autres constituants

Les autres constituants sont préparés dans une solution mère d'eau MilliQ :

Molécule	Concentration finale	Référence
NaCl	2,5 g/L	Sigma 71376
K_2HPO_4	1 g/L	Sigma P9666
Dextrose	5,5 g/L	Sigma D9334
L-cystéine hydrochloride	500 mg/L	Sigma 30120
KH_2PO_4	1 g/L	Sigma P9791
NH_4Cl	1g/L	Sigma 326372
Thioglycolate de sodium	500 mg/L	Sigma B2629
Résazurine	1 mg/L	Sigma 199302
MgSO_4	100 mg/L	Sigma M7506
CaCl_2	20 mg/L	Sigma C4901

L'hémine (51280 – Sigma) est dissoute dans une solution mère NaOH 1N (S2567 – Sigma) dans une solution mère de 1,25g/L. Concentration finale : 5mg/L

5) Les vitamines

Chaque vitamine a sa propre solution mère :

Vitamine	Concentration finale	Solvant	Référence
Acide ascorbique	1,7 mg/L	H ₂ O	Sigma A5960
Acide D-panthothanique	2,8 mg/L	H ₂ O	Sigma P2250
Acide 4-Aminobenzoïque	1,7 mg/L	Ethanol 70%	Sigma A9878
Acide folique	100 µg/L	NaOH 1N	Sigma F7876
Biotine	50 µg/L	NaOH 0,1N	Sigma B4501
Cobalamine	2,6 mg/L	H ₂ O	Sigma V2876
Nicotinamide	5,6 mg/L	H ₂ O	Sigma N3376
Pyridoxine hydrochloride	900 µg/L	H ₂ O	Sigma P9755
Pyridoxal hydrochloride	900 µg/L	H ₂ O	Sigma P9130
Pyridoxamine dihydrochloride	900 µg/L	H ₂ O	Sigma P9380
Phylloquinone	1,7 mg/L	Acétone	Sigma 95271
Riboflavine	1 mg/L	NaOH 1N	Sigma R4500
Thiamine hydrochloride	300 µg/L	H ₂ O	Sigma T4625

6) Finalisation du milieu

Les différentes solutions mères sont mélangées à volume final de 900ml ensemble puis le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$ avec de l'HCl ou du NaOH pour diminuer ou pour augmenter respectivement le pH. Le milieu est ensuite complété d'eau MilliQ pour obtenir un volume final d'un litre. Enfin, le milieu est stérilisé par filtration à l'aide d'un « Stericup » de 1L de porosité 0,25µm (SCGPU11RE – Merck Millipore).

Référence des solvants :

NaOH 1N	Sigma: S2567
HCl 3N	Fischer: CL05.0315.1000
Acétone	Fischer: A1050
Ethanol 70%	Sigma: 02877

c) Milieu synthétique MScOA

Le milieu synthétique dédié à la croissance de *Methylobacterium extorquens* se prépare en deux solutions mères.

1) Solution 1

Molécule	Concentration finale	Référence
NH ₄ Cl	1,62 g/L	Sigma 71376
MgSO ₄	200 mg/L	Sigma M7506
K ₂ HPO ₄	2,21 g/L	Sigma P9666
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	1,25 g/L	Sigma 57907
Pyruvate	2 g/L	Sigma P2256

2) Solution 2

Molécule	Concentration finale	Référence
ZnSO ₄ .7H ₂ O	4,5 mg/L	Sigma 20251
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,3 mg/L	Sigma 60818
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 mg/L	Sigma M3634
H ₃ BO ₃	1 mg/L	Sigma B6768
CaCl ₂	2,5 mg/L	Sigma C4901
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,4 mg/L	Sigma 31439
FeSO ₄ .7H ₂ O	3 mg/L	Sigma 215422
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,3 mg/L	Sigma C8027

Les deux solutions mères sont mélangées ensemble puis le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$ avec de l'HCl ou du NaOH pour diminuer ou pour augmenter respectivement le pH. Le milieu est ensuite complété d'eau MilliQ pour obtenir un volume final d'un litre. Enfin, le milieu est

stérilisé par filtration à l'aide d'un « Stericup » de 1L de porosité 0,25µm (SCGPU11RE – Merck Millipore).

3) Sources de carbone testées dans le MSCoA

Différentes sources de carbone ont été testées dans le milieu synthétique :

Molécule	Concentrations testées	Référence
Méthylamine	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	M0505 Sigma
Formaldéhyde	300µl/L; 600µl/L; 900µl/L; 1,2ml/L	F8775 Sigma
Acide formique	300µl/L; 600µl/L; 900µl/L; 1,2ml/L	Merck 1.00264.1000
Sodium formate	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma 71539
Acide acétique	300µl/L; 600µl/L; 900µl/L; 1,2ml/L	Sigma 320099
Acétate de sodium	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma S2889
Oxalate de potassium	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma P0963
Pyruvate de sodium	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma P2256
Acide malique	0,1g/L; 0,2g/L; 0,5g/L; 1g/L	Merck 1.00382.0250
Malate de sodium	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma M9138
Succinate de sodium dibasic hexahydrate	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma S5047
Triméthyl-glycine	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma B2629
Glucose	0,1g/L; 0,5g/L; 1g/L; 2g/L	Sigma D9434

Les liquides ou les molécules dissoutes dans de l'eau MilliQ sont stérilisés par filtration à l'aide de Millex PES hydrophiles de porosité 0,45 µm (SLHP033RS – Merck Millipore) et de seringues de 20 ml (100924B - Terumo). Ils sont ensuite ajoutés au milieu final à la concentration désirée.

d) Préparation des milieux synthétiques dans un préparateur semi-industriel

Pour des volumes allant de 5 à 10 litres, l'homogénéisation des solutions mères calculées en conséquence, ainsi que l'ajustement du pH sont réalisés à l'aide d'un préparateur « AES laboratoire » (519000). Le milieu est ensuite stérilisé par filtration sur un filtre « Millipak 100 » de porosité 0,22 µm (n° de série : 0218) couplé à une pompe péristaltique « cole-parner masterflex L/S ».

B. Les différentes techniques d'analyse de la croissance des micro-organismes

Différentes techniques ont été évaluées afin d'analyser au mieux la croissance des micro-organismes.

I. Mesure de densité optique

Deux lecteurs de plaques ont été mis à contribution afin de pouvoir comparer les résultats.

a) *Lecteur de plaque Gemini©*

Les bactéries sont inoculées dans 50ml de milieu de culture à une concentration permettant d'obtenir entre 35 et 40 UFC pour 300 μ l. 300 μ l sont déposés dans chaque puit de la microplaque (655090 – Greiner Bio One). Les courbes de croissance sont réalisées par lecture de DO à 600 nm toutes les heures à l'aide du spectrophotomètre Gemini « *SpectraMax Plus³⁸⁴* » (Molecular Device). Une incubation $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ est sélectionnée pour toutes les bactéries excepté *M. extorquens* qui est incubée à $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. L'appareil lit automatiquement l'ensemble des puits de la microplaque toutes les heures après agitation de la microplaque. Un logiciel d'exploitation « SoftMax Pro » permet de traiter directement les données obtenues et génère les courbes de croissance. Les expériences sont réalisées au minimum en triplicata.

b) *Lecteur de plaque Bioscreen©*

Le protocole est identique à celui utilisé pour le lecteur de plaque Gemini. On notera que l'inoculation est réalisée de manière à obtenir entre 35 et 40 UFC pour 250 μ l et que toutes les bactéries sont incubées à $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Lecteur de plaque : Bioscreen C MBR ; microplaque : Honeycomb ref : 9502550 logiciel : EZExperiment.

II. Cytométrie en flux

a) *Suivi d'une culture de Methylobacterium sp. en cytométrie*

Les milieux de culture liquide R2B et TSB (Millipore) dilués à 50% avec de l'eau stérile ont été inoculés avec une culture de *M. extorquens* ATCC 43645 à une concentration finale de 100 UFC/ml de milieu puis incubés 5 jours à 20-25°C. 3 aliquots de 1.0 ml de chaque milieu inoculé ont été prélevés au temps 0 puis toutes les 24 heures pendant 5 jours.

b) *Contrôle de la viabilité des bactéries*

La viabilité des populations bactériennes a été vérifiée avec le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (L7007, Invitrogen). Les solutions concentrées A (Syto 9, 1.67mM / Propidium iodide, 1.67 mM, 300 µl de solution DMSO) et B (Syto 9, 1.67mM / Propidium iodide, 18.3 mM, 300 µl de solution DMSO) sont stockées à -20°C et protégées de la lumière. Après décongélation à température ambiante, les solutions sont brièvement centrifugées avant ouverture. La solution de travail est composée d'un mélange de 30 µl de solution A et 30 µl de solution B. 3 µl de la solution de travail sont ajoutés à 1.0 ml de suspension bactérienne. Les bactéries et les fluorochromes sont incubés à température ambiante, protégés de la lumière pendant 15 minutes. 200 µl de chaque aliquot contenant la suspension bactérienne marquée sont déposés dans une microplaque de 96 puits (353910, BD Falcon).

c) *Mesure par cytométrie en flux*

Les mesures de cytométrie en flux ont été effectuées avec le système « guava easyCyte 5HT HPL » (0500-4009, Merck Millipore) équipé d'un laser bleu 75 mW (488 nm). L'analyse graphique du forward scatter (FSC) et side scatter (SSC) (par l'utilisateur) a permis de faire la discrimination entre les particules inorganiques et les micro-organismes. L'excitation/émission des fluorochromes sont 480/500 nm pour Syto 9 (fluorescence verte) et 490/635 nm pour l'iodure de propidium (fluorescence rouge). Les fluorescences

correspondantes ont été analysées sur la population bactérienne pour déterminer la viabilité et la concentration des micro-organismes parmi les éléments concernés. Les données ont été évaluées en utilisant le logiciel guavaSoft (2.6, Merck Millipore).

III. PCR semi-quantitative

a) *Lyse des micro-organismes*

Pour chaque temps défini de culture , 100 µl de la culture de *Methylobacterium sp.* sont ajoutés à 400µl de tampon de lyse de composition 1M solution Guanidine hydrochloride, 0.5% solution N-Lauryl Sarcosyl, 5mMTris et 0.5mM EDTA dans des tubes eppendorf de 1.5ml. Les tubes sont ensuite immédiatement placés dans un instrument de sonication (optimisé par le laboratoire de recherche et développement de Merck Millipore Molsheim) et soniqués pendant 4min à une puissance de 750W et une fréquence de 20 kHz.

b) *Purification des acides nucléiques*

Après sonication, les acides nucléiques sont purifiés au moyen du kit MilliPrep basé sur des billes magnétiques (Merck-Millipore ref. MPRPMYC48) et de l'instrument KingFischer ML (ThermoScientific, ref.5400050) permettant la purification de 15 échantillons simultanément.

c) *PCR en temps réel*

La PCR en temps réel utilisée pour détecter l'ADN de *Methylobacterium extorquens* est basée sur la technologie SYBR Green I qui se fixe à l'ADN double brin de manière non spécifique. Un fragment de 144pb du gène de l'ARNr 16S de *M.extorquens* a été amplifié en utilisant la paire d'amorces M.ext_F (5'-AACACATGCAAGTCGAGCGG-3') et M.ext_R (5'-CGGCAGTAAACCTTCCCCA-3') synthétisés par Eurogentec (Belgique).

Le mélange réactionnel a été préparé comme suit : 15µl du mix QuantiTect 2X (Qiagen, ref. 204145), 0.5µM de chaque primer, 2.25µl d'eau nuclease-free et 10µl d'échantillon ou d'ADN contrôle.

La PCR en temps réel est réalisée sur le cycleur Realplex (Eppendorf, réf. 6300 000.507) dans des plaques de PCR temps réel Twintec (Eppendorf, ref. 0030 128.672) selon le cycle : 95°C 15 minutes puis 40 fois [95°C 15 secondes – 58°C 60 secondes] suivi par la réalisation d'une melting curve afin de vérifier la spécificité du produit amplifié. Chaque échantillon est dupliqué et chaque essai de PCR contient un contrôle positif et un contrôle négatif. Les valeurs de Ct (cycle threshold) sont déterminées en utilisant l'algorithme automatique de détermination du seuil.

C. Méthodes d'analyse des composants des milieux complexes

I. ICP-AES (Inductively-Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy)

L'ICP-AES (inductively-coupled plasma atomic emission spectroscopy, en français spectroscopie à émission atomique) est une méthode d'analyse permettant le dosage des éléments inorganiques présents dans un échantillon qui a été préalablement ionisé. En effet, après dissolution de l'échantillon par un acide, celui-ci est injecté par un nébuliseur sous forme d'aérosol dans un plasma d'argon. La chaleur du plasma (pouvant atteindre 7700°C) va totalement ioniser l'échantillon. Les atomes alors excités vont émettre des photons. La longueur d'onde du photon est caractéristique de chaque élément. Les émissions de photons sont alors mesurées par un capteur permettant de connaître la quantité précise de chaque élément. L'ICP-AES a été utilisée pour évaluer la concentration des oligo-éléments dans les milieux de culture. Il s'agit d'un système de chromatographie en phase liquide à haute pression couplé à la spectrométrie de masse. Les acides aminés présents dans les échantillons à analyser sont dérivés à l'aide d'un chromophore (6-aminoquinolyl-n-hydroxysuccinimidyl carbamate, AQC) afin d'être détectés grâce à leur absorbance aux UV. Le passage de l'échantillon dans l'UPLC va permettre la séparation des composants. Le système va analyser

l'absorbance des UV par les acides aminés afin d'obtenir la valeur de l'aire des pics de chaque acide aminé.

a) *Préparation des échantillons*

50 µl de chaque milieu de culture à analyser sont dilués avec 50 µl d'acide nitrique (30702 – Sigma) à 1%. La gamme étalon de chaque oligo-élément a été réalisée. Chaque oligo-élément est dilué dans de l'acide nitrique à 1%.

b) *Utilisation de l'ICP-AES*

ICP-AES (inductively coupled plasma- optical emission spectrometry) Varian 720 ES comprenant un générateur de radio-fréquence : 1.2 kW et un nébuliseur de type Meinhard. Les débits suivants ont été utilisés : gaz plasma = 15 l.min⁻¹ ; gaz nébuliseur = 1 l.min⁻¹ ; gaz auxiliaire = 1 l.min⁻¹. La longueur d'onde a été fixée à 193.7 nm. Tous les échantillons ont été analysés en duplicata.

II. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Mass spectrometry (MS)

L'UPLC-MS a été utilisée pour déterminer les concentrations en acides aminés des milieux de culture. Les échantillons de chaque milieu de culture sont d'abord dérivés par la méthode AQC puis analysés par chromatographie en phase liquide.

a) *Préparation des échantillons (dérivatisation AQC)*

35µl de tampon de borate sont ajoutés dans des microtubes de 1.5 ml correspondant au nombre d'échantillons. Après homogénéisation au vortex, 5 µl d'échantillon sont ajoutés dans chaque tube ainsi que 10 µl du kit de dérivation AccQ.Tag ultra de Waters. Les tubes sont vortexés puis laissés au repos pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être placés dans le thermomixer à 55 °C pendant 10 minutes. Après deux minutes à température ambiante, les échantillons sont placés dans une micro-centrifugeuse quelques secondes.

b) Configuration de la chromatographie à phase liquide

Les configurations utilisées pour la chromatographie sont les suivantes : Colonne: UPLC BEH C18 1.7µm. (AQC spécial) ; débit: 0,7 ml / min ; température de la colonne: 55 ° C ; méthode d'entrée: AccQTag_equil2. 1 microlitre injecté ; méthode MS: AccQTag_MRM ; MS air: ESCI_SCAN_FINAL. **Solvant A** : éluant A concentré de Waters, 10% dans l'eau ultra-pure. **Solvant B**: acétonitrile. Analyse des UV à 254 nm.

D. Molécules évaluées impactant la croissance bactérienne

Les molécules ont été testées sur *B. subtilis*, *E. coli*, *M. extorquens* et *S. epidermidis* dans du milieu TSB dilué de moitié ainsi que dans le milieu MScOA sur *M. extorquens*. L'évaluation de la croissance s'est faite par détection visuelle dans des bouteilles de 100 ml ainsi que par lecture de DO par lecteur de plaque comme vu précédemment. Le nombre d'UFC ajouté dans les bouteilles ou les puits des microplaques est le même que dans les protocoles précédents.

Concentration des molécules testées :

Molécule	Concentrations testées	Solvant	Référence
Acide diaminopimelique	100; 250; 500 mg/L	H ₂ O	Sigma D1377
Adénosine monophosphate cyclique	3,6; 36; 72 mg/L	H ₂ O	Sigma A1752
Pyruvate	0,5; 1; 10 g/L	H ₂ O	Sigma P9666
Oxaloacétate	100; 250; 500 mg/L	H ₂ O	Sigma 04126
1,2-Dihydroxybenzène	7,7; 15,3; 1000 mg/L	H ₂ O	Sigma 135011
3,4-Acide dihydroxybenzoïque	9,5; 19,5; 1000 mg/L	H ₂ O	Sigma 37580
Dopamine	10; 100; 1000 mg/L	H ₂ O	Sigma PHR1090
Norépinephrine	10; 100; 1000 mg/L	H ₂ O	Sigma A7256
7-Hydroxy flavone	10; 100; 1000 mg/L	NaOH 1N 10%	Sigma H4530
Trans-chalcone	10; 100; 1000 mg/L	NaOH 1N 10%	Sigma 136123
Naringénine	10; 100; 1000 mg/L	NaOH 1 N 10%	Sigma N5893
Acide indole 3-butérique	10; 100; 1000 mg/L	Ethanol	Sigma I5386
2,4-dichlorophenoxy-acétique	10; 100; 1000 mg/L	Ethanol	Sigma D7299
Acide 1-naphtalène acétique	10; 100; 1000 mg/L	Ethanol	Sigma N0640
Chlorure de cérium	0,01; 0,1; 1 mg/L	H ₂ O	Sigma 229555
Chlorure d'yttrium (III)	0,01; 0,1; 1 mg/L	H ₂ O	Sigma 451363
Chlorure de lutécium hexahydrate	0,01; 0,1; 1 mg/L	H ₂ O	Sigma 542075
Chlorure de lanthane heptahydrate	0,01; 0,1; 1 mg/L	H ₂ O	Sigma 262072

Référence des solvants :

NaOH 1N : Sigma : S2567

Ethanol : Merck : 1.00983.1000

Après dissolution dans leur solution mères, les molécules sont stérilisées par filtration à l'aide de Millex PES hydrophiles de porosité 0,45 µm (SLHP033RS – Merck Millipore) et de seringues de 20 ml (100924B - Terumo). Elles sont ensuite ajoutées à la concentration voulue dans le milieu synthétique ou complexe.

PARTIE III

RÉSULTATS/DISCUSSION

III. Résultats/Discussion

De nombreuses bactéries sont retrouvées dans les systèmes de distribution d'eau des industries pharmaceutiques, malgré la mise en place de divers traitements de décontamination. Les Pharmacopées préconisent des méthodes de détection de ces contaminants reposant sur la croissance des micro-organismes utilisant des milieux de culture complexes. L'étude de ces micro-organismes représente le point de départ du projet de thèse. Ce dernier a été divisé en deux grands axes de recherche qui ont été menés en parallèle. Le premier axe consiste à élaborer deux milieux de culture synthétiques, aérobie et anaérobie, permettant la détection rapide de ces bactéries. Ils devront permettre la croissance d'une large gamme de micro-organismes et favoriser ceux ayant un développement lent. Le deuxième axe se focalisera sur l'étude de la survie de ces micro-organismes dans ces eaux industrielles ultra pures, et de ce fait très pauvres en nutriments.

La présentation des résultats se décompose en trois grandes parties :

A. La formulation et la caractérisation des milieux synthétiques

B. L'évaluation de molécules pouvant impacter positivement la croissance bactérienne

C. L'étude des mécanismes de survie des micro-organismes dans les systèmes d'eau ultra purifiée.

Cette dernière partie fait l'objet d'un article soumis pour publication.

La première partie la démarche scientifique ainsi que les principaux résultats qui ont mené à l'élaboration des milieux synthétiques. Le choix des composants ainsi que la détermination des concentrations des différentes familles de nutriments sont tout d'abord présentés, suivie de l'étude de certains micro-organismes ne se développant pas dans les milieux synthétiques, dont notamment *M. extorquens*. Enfin, les derniers résultats expliquent les solutions mises en place afin d'obtenir la croissance de la quasi-totalité des micro-organismes.

La deuxième partie des résultats est basée sur l'évaluation de molécules potentiellement capables d'améliorer la croissance bactérienne dans le but d'être ajoutées aux milieux synthétiques.

Pour finir, la troisième partie expose, dans la publication soumise, les recherches menées afin de comprendre les moyens de survie mis en œuvre par les contaminants industriels dans les environnements très pauvres en nutriments. L'étude de la formation de biofilms de différentes bactéries a permis de mettre en évidence de fortes interactions entre certaines d'entre elles. L'identification des molécules permettant la communication entre ces bactéries a également fait l'objet d'investigations.

A. Elaboration des milieux synthétiques

Afin de pouvoir évaluer les performances du milieu synthétique aérobie (MSaé) et du milieu anaérobie (MSana), il faut en premier lieu déterminer les différents critères de comparaison.

I. Liste des micro-organismes

Les milieux synthétiques doivent permettre la croissance de contaminants potentiellement retrouvés dans les industries pharmaceutiques et agro-alimentaires. Pour ce faire, la performance des milieux a été évaluée sur une sélection de souches représentatives déterminée à partir des textes réglementaires notamment des pharmacopées européenne, américaine et japonaise. Cette sélection comporte des bactéries aux exigences nutritionnelles variées. En effet, certaines nécessitent un fort apport en nutriments pour se développer comme *Staphylococcus epidermidis* ou *Clostridium sporogenes* alors que d'autres ne nécessitent que très peu de nutriments comme *E. coli* et *M. extorquens*. Certaines bactéries sont considérées comme bactéries à développement lent comme *Ralstonia pickettii* ou *M. extorquens* car leur croissance est plus lente que la majorité des bactéries du panel sur des milieux riches en nutriments. Une levure (*Candida albicans*) et un champignon (*Aspergillus brasiliensis*) sont également présents afin d'évaluer le comportement d'organismes eucaryotes. Cependant, afin de vérifier ou confirmer certains résultats, d'autres souches ont

Souches \ Micro-organismes	Bactérie à Gram -	Bactérie à Gram +	Levure	Champignon
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404				X
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633		X		
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	X			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			X	
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404		X		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	X			
<i>Methylobacterium extorquens</i> ATCC 43645	X			
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919		X		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	X			
<i>Ralstonia pickettii</i> ATCC 27511	X			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538		X		
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228		X		

Tableau 5 : Liste des micro-organismes testés afin d'évaluer les performances des milieux synthétiques.

pu être ajoutées au panel. Le **tableau 5** représente la liste de micro-organismes du panel. Il est important de préciser que le panel entier n'a été testé qu'aux étapes importantes du développement des milieux.

II. Les milieux de culture référents

Les performances des milieux synthétiques ont été comparées à deux milieux de culture standards industriels en matière de contrôle microbiologique : le Tryptic Soy Broth (TSB) et le Fluid Thioglycollate Medium (FTM). Ces milieux sont constitués de peptones et d'extraits de levure. Les peptones sont des digestions de protéines qui peuvent être de différentes origines : les peptones végétales dont celles de soja étant les plus utilisées pour la fabrication de milieux de culture ; les peptones animales comme les peptones de viandes ou de cœur de bœuf et les peptones dérivées du lait comme les peptones de lactosérum ou de caséine. Ces protéines sont digérées par des enzymes protéolytiques comme les pepsines, la trypsine ou la papaïne, voire parfois de manière chimique par différents acides. Selon la méthode de digestion utilisée et l'origine des protéines, la composition et la taille des peptides qui en résultent peuvent fortement varier. En effet, les peptones produites par digestion pepsique contiennent de grands peptides constitués de nombreux acides aminés par rapport aux autres types de digestion générant de petits peptides et des acides aminés libres (Leyral and Vierling, 2007). Les extraits de levure sont des digestions de levures, le plus souvent *Saccharomyces cerevisiae*, également composés d'acides aminés mais aussi de vitamines et de sucres. Chaque lot de peptones a donc une composition non définie et qui peut être très variable. Il est donc difficile de savoir la composition exacte et la concentration de chaque composant. La difficulté dans l'élaboration d'un milieu synthétique ayant des performances au moins équivalentes à l'un de ces milieux réside dans le fait d'apporter les mêmes molécules aux mêmes concentrations fournies par les peptones ou extraits de levure.

Les milieux de références TSB et FTM ont la composition suivante :

- **Tryptic Soy Broth:**

Peptone de caséine.....	17 g/L
Peptone de soja.....	3 g/L
Chlorure de sodium.....	5 g/L
Dextrose.....	2,5 g/L
Dipotassium phosphate.....	2,5 g/L

Le pH final est de $7,3 \pm 0,2$ à 25°C .

La peptone de caséine est un hydrolysate de caséines, protéines constitutives du lait. Le milieu contient également de la peptone de soja dont la proportion en acides aminés est différente. Les autres constituants du milieu sont le dextrose qui représente la source de carbone, le chlorure de sodium permettant l'isotonie du milieu ainsi qu'une source d'ions sodium et de dipotassium phosphate ayant un rôle de tampon, ainsi qu'une source de potassium. Ce milieu permet le développement de micro-organismes aérobies.

- **Fluid Thioglycollate Medium:**

Peptone de caséine.....	15 g/L
Extraits de levure.....	5 g/L
Chlorure de sodium.....	2,5 g/L
Dextrose.....	5,5 g/L
Thioglycolate de sodium.....	2,5 g/L
L-cystine	0,5 g/L
Résazurine.....	0,001 g/L
Agar.....	0,75 g/L

Le pH final est de $7,1 \pm 0,2$ à 25°C .

Ce milieu, utilisé pour le développement de micro-organismes anaérobies, est constitué de peptone de caséine comme le TSB mais également d'extraits de levure, plus riche en vitamines et éléments variables comme des fragments membranaires et macromolécules d'origine intracellulaire. Le milieu contient aussi du chlorure de sodium ainsi que du dextrose. Les autres composés permettent le maintien de l'anaérobie au sein du milieu. En effet, le thioglycolate

de sodium est un agent réducteur qui va permettre la conversion de l'oxygène en eau. La L-cystine est également un agent réducteur maintenant un faible potentiel redox dans le milieu et peut être également assimilée comme acide aminé par les organismes. L'agar en faible dose diminue également le potentiel redox et maintient les flux du milieu empêchant les molécules d'oxygène potentiellement présentes de diffuser à l'intérieur de ce dernier. Enfin, la résazurine est un indicateur coloré d'oxydo-réduction. Il apparaît rose quand il est oxydé et incolore lorsqu'il est réduit. Cela signifie que lorsque le milieu est incolore, il n'y a plus de molécules d'oxygène dans le milieu.

Par soucis de simplicité et de clarification des résultats, l'élaboration des deux milieux synthétiques sera présentée en plusieurs parties, même si plusieurs de ces parties ont été réalisées en parallèle, amenant à une chronologie pouvant être différente des résultats présentés. Pour ce faire, les composants des milieux ont été répartis en différentes familles que sont les **acides aminés**, les **bases azotées**, les **oligo-éléments**, les **vitamines** et les **sels** (contenant également les sources de carbone). Lorsque les résultats obtenus avec une famille étaient satisfaisants, la composition était fixée et une autre famille était étudiée. Notons également que seuls les résultats pertinents seront présentés.

a) *Mise au point d'une formulation de base synthétique*

Les premières formulations des milieux de culture synthétiques aérobie et anaérobie ont été réalisées suite à une étude bibliographique de différents milieux synthétiques. Une base commune en acides aminés, bases azotées, oligo-éléments, vitamines et sels a été établie pour les milieux synthétiques MSaé et MSana. La composition suivante indique la concentration de chaque élément :

- 17 acides aminés..... 325 µg/L
- 5 bases azotées.....10 mg/L
- 7 oligo-éléments.....5 µg/L
- 11 vitamines.....1 mg/L
- 4 sels ajoutés (KH₂PO₄ : 1 g/L ; NH₄Cl : 1 g/L ; MgSO₄ : 0,1 g/L ; CaCl₂: 0,02 g/L)

- Les autres composants (sels et sources de carbone) spécifique des milieux **TSB** ou **FTM** (selon le milieu aérobie ou anaérobie) hormis les peptones ou extraits de levure ont été ajoutés.

Après ajustement du pH à 7,1, les milieux ont été autoclavés 15 minutes à 121°C (voir en **Annexe 1** la composition détaillée des milieux). La qualité visuelle et la performance des deux milieux n'étaient pas satisfaisantes car ils contenaient des précipités après l'étape d'autoclave et de nombreuses bactéries ne se développaient pas. Ces deux milieux synthétiques sont le point de départ des résultats qui suivent.

Les premières évaluations des milieux ont été faites de manière visuelle tous les jours et ce jusqu'à l'observation de la croissance des micro-organismes. Si de petits agrégats ou un léger trouble sont observés par rapport au milieu témoin non inoculé, le test est positif. La mesure de densité optique à 600 nm n'a été utilisée que pour affiner certains résultats. Pour un test donné, le même cryotube et la même quantité d'inoculum sont utilisés pour tous les échantillons, et ces derniers sont incubés dans les mêmes conditions. De ce fait, les milieux sont comparables entre eux pour chaque test.

III. Les oligo-éléments

Les métaux ont un rôle capital dans le métabolisme et certains sont utilisés par la cellule bactérienne en tout début de phase de latence. Dans les milieux de culture complexes, les oligo-éléments sont fournis par la verrerie utilisée pour la fabrication des milieux ainsi que par les peptones et extraits de levure. Il est donc très difficile d'avoir une idée précise de la formulation et de la quantité présente de ces métaux dans les milieux de culture complexes.

Afin de mettre en évidence la nécessité d'ajouter les oligo-éléments dans les deux milieux synthétiques, les premiers milieux synthétiques ne contenaient pas d'oligo-éléments. Les premiers tests ont été réalisés sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, bactéries à Gram négatif peu exigeantes en matière de nutriments, ainsi que *C. albicans*, eucaryote plus exigeant d'un point de vue nutritif, dans le milieu MSaé. *E. coli* étant aérobie facultative, elle a également été testée dans le milieu MSana ainsi que *C. sporogenes*, bactérie Gram positif, exigeante d'un

point de vue nutritif. Il s'est avéré qu'aucune souche ne s'est développée dans les milieux synthétiques (données non présentées).

a) Les différentes formes de métaux utilisés

Les oligo-éléments contenus dans les milieux synthétiques sont toujours présents en très faible quantité et sous forme de sels. Il est cependant difficile d'affirmer que les métaux retrouvés dans les milieux complexes sont exclusivement sous forme de sels. Afin d'obtenir le meilleur apport en oligo-éléments, des ajouts sous forme de poudre de métaux bruts et des sels de métaux ont été comparés.

1) Limites de l'utilisation des poudres de métaux purs

Des poudres de métaux de cobalt, de cuivre, de fer, de manganèse, de molybdène, de nickel et de zinc ont été broyées afin d'obtenir les poudres les plus fines possibles. Les poudres ont été ensuite mélangées à de l'eau stérile et ajoutées à raison de 5 µg/L dans les milieux. Les premiers tests visant à évaluer les poudres de métaux ont été réalisés sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* dans le milieu MSaé sur *E. coli* et *C. sporogenes* dans le milieu MSana. La **figure 36** illustre les résultats obtenus entre le TSB et le milieu MSaé. Le temps de la détection visuelle de la croissance des souches dans les bouteilles contenant 100 ml de milieu est représenté sous forme d'histogramme.

La figure indique que le développement d'*E. coli* devient visible à l'œil nu au terme de 21h dans le milieu TSB à 22,5°C ± 2,5. Il lui faut un peu plus de 29h pour apparaître dans le milieu synthétique MSaé. *P. aeruginosa* accumule un retard d'environ 7h dans le milieu MSaé par rapport au milieu TSB. *C. albicans* quant à lui met 41h à se développer dans le milieu TSB et ne se développe pas dans le milieu synthétique. Pour les milieux anaérobies, *E. coli* se développe avec un retard de 9h dans le milieu synthétique par rapport au FTM. *C. sporogenes* ne se développe pas dans le MSana. En conclusion, les milieux contenant les poudres d'oligo-éléments ne permettent pas la croissance de *C. albicans* et *C. sporogenes* et les souches *P.*

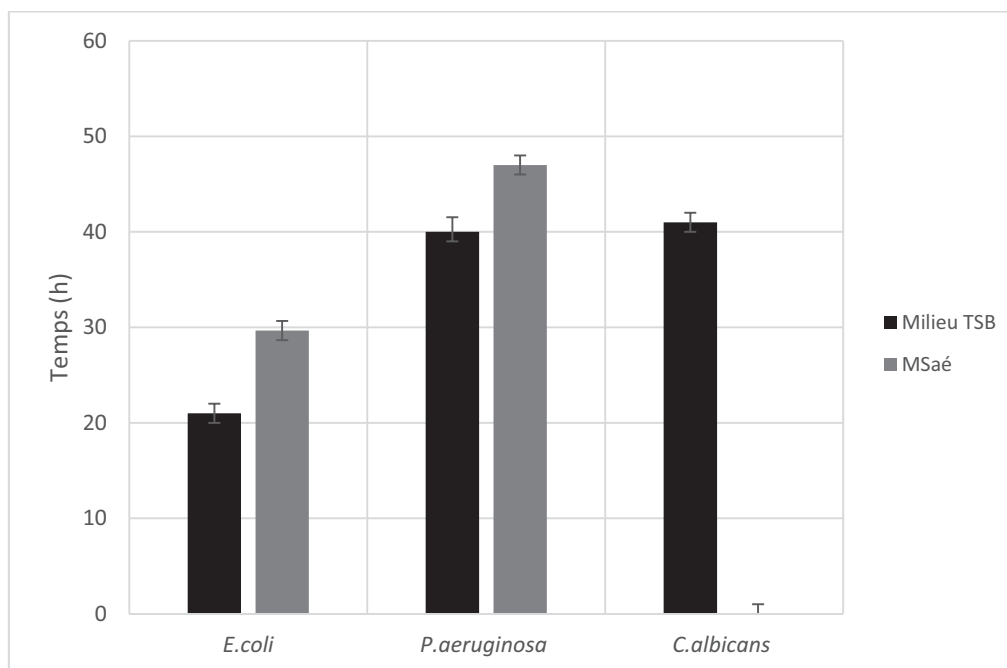


Figure 36 : Détection visuelle du début de croissance des souches *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* dans les milieux TSB et MSAé. La détection visuelle est représentée en noir dans le milieu TS et en gris dans le milieu MSAé.

aeruginosa et *E. coli* affichaient un retard de croissance conséquent. Cela peut être dû à une trop faible concentration en oligo-éléments car il est difficile de garantir la concentration exacte du métal dans la solution mère. Afin de pouvoir les quantifier de manière plus précise, des solutions de sels de métaux ont été préparées.

2) Avantages des sels métalliques

Les oligo-éléments peuvent se trouver sous différentes formes de sels. La difficulté réside dans le fait de trouver le bon compromis entre les chlorures et les sulfates afin d'influencer le moins possible la pression osmotique du milieu. Le **tableau 6** montre les différents sels métalliques qui ont été choisis pour la nouvelle formulation des milieux synthétiques.

Afin d'équilibrer les concentrations des sels de métaux par rapport aux métaux en poudre, la concentration de chaque sel de métal a été augmentée à 8 µg/L de milieu. Le même panel de micro-organismes précédemment utilisé pour les métaux en poudre a été testé. Les résultats obtenus étaient similaires aux milieux synthétiques contenant les métaux en poudre (résultats non montrés). Cependant, les solutions mères d'oligo-éléments sont limpides, hormis celle du

molybdène, et il est facile de prélever de manière précise la quantité de sels de métaux désirée. De ce fait, les sels de métaux ont été retenus pour la préparation des futurs milieux synthétiques.

Oligo-élément	Sel correspondant	Formule chimique	% de l'élément (en masse)
Cobalt	Chlorure de Cobalt (II)	CoCl ₂	45,36 %
Cuivre	Chlorure du cuivre dihydraté	CuCl ₂ .2H ₂ O	37,27 %
Fer	Sulfate de fer (II) heptahydraté	FeSO ₄ .7H ₂ O	19,77 %
Manganèse	Chlorure de manganèse (II) tetrahydraté	Cl ₂ MN.4H ₂ O	27,7%
Molybdène	Molybdate de sodium dihydraté	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	39,65 %
Nickel	Sulfate de nickel (II) hexahydraté	NiSO ₄ .6H ₂ O	22,32 %
Zinc	Chlorure de zinc	ZnCl ₂	47,98 %

Tableau 6 : Sels d'oligo-éléments utilisés pour remplacer les poudres de métaux.

b) Méthodes utilisées pour définir les concentrations d'oligo-éléments

Afin d'estimer la concentration de chaque oligo-élément présent dans les milieux TSB et FTM ainsi que dans les milieux synthétiques et dans les différentes peptones, des analyses de ces milieux par ICP-AES (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, spectroscopie à émission atomique) ont été réalisées.

1) Analyse des milieux par ICP-AES

1) TSB Merck Millipore
2) FTM Merck Millipore
3) MSaé métaux liquides
4) MSana métaux liquides
5) MSaé Ø métaux
6) MSana Ø métaux
7) MSaé métaux poudre
8) MSana métaux poudre
9) R2B
10) Extrait de levure
11) Peptone de caséine
12) Proteose peptone
13) Peptone de soja
14) NaCl
15) K ₂ HPO ₄
16) KH ₂ PO ₄
17) NH ₄ Cl
18) MgSO ₄
19) CaCl ₂
20) H ₂ O milliQ

Vingt échantillons ont été analysés comme le montre le **tableau 7**. Les échantillons étaient composés de milieux de culture dont le TSB, FTM et les milieux de culture synthétiques contenant différentes préparations de métaux. Le milieu R2A, milieu plus pauvre en nutriments ainsi que différents types de peptones ont également été analysés. Enfin, des constituants « classiques » des milieux complexes comme certains sels ont aussi été intégrés à l'étude. Afin d'avoir une vision plus représentative des concentrations en métaux, deux lots différents de chaque échantillon ont été analysés.

Tableau 7 : Liste des 20 échantillons analysés par ICP-AES. Les 9 premiers échantillons sont des milieux de culture synthétiques ou complexes. Les autres échantillons sont des composants utilisés dans les milieux de culture complexes.

a. Résultats obtenus

Les données sont transcrites en ppb (part per billion, en français partie par milliard) correspondant à 1 µg/L. Les résultats obtenus pour les milieux TSB, MSaé contenant des sels de métaux et MSaé sans métaux sont représentés **tableau 8**. Les résultats peuvent être légèrement différents entre les deux échantillons mais les ordres de grandeur restent les mêmes. On remarque que dans le milieu TSB commercialisé (milieu complexe), les métaux sont présents en moyenne entre 10 et 20 µg/L : 10 µg/L en moyenne pour le cobalt, 16 µg/L pour le cuivre, 18 µg/L pour le manganèse, 20 µg/L pour le molybdène et 11 µg/L pour le nickel. Cependant, le fer a une concentration moyenne de 417 µg/L et le zinc de 1185 µg/L. Le fer peut être jusqu'à 40 fois plus concentré et le zinc jusqu'à 100 fois par rapport aux 5 autres métaux. Dans le milieu MSaé contenant les métaux sous forme de poudre, les données sont

plus compliquées à interpréter car le seuil de sensibilité de l'ICP-AES semble différent entre les deux échantillons. On observe que la concentration varie en moyenne de 0,5 à 10 µg/L. Les concentrations de fer et de molybdène semblent cependant inférieures à celle des autres métaux. Enfin, le milieu synthétique sans oligo-éléments ne contient qu'une très faible quantité de certains métaux, ceux-ci pouvant provenir de la contamination des autres composants du milieu ou de la verrerie utilisée lors de sa fabrication. Les résultats des autres échantillons sont représentés en **Annexe 2** et **3**.

	µg/l	Fer	Cobalt	Zinc	Manganèse	Molybdène	Cuivre	Nickel
TSB Merck Millipore	échantillon 1	443,176	12,0028	1177,73	22,0855	17,9862	17,1598	12,747
	échantillon 2	391,751	8,1127	1191,546	14,581	21,432	14,56	8,965
	moyenne	417,4635	10,05775	1184,638	18,33325	19,7091	15,8599	10,856
MSaé sels de métaux	échantillon 1	1,84872	3,01402	4,58186	5,15302	0	4,58976	2,51478
	échantillon 2	0	0	0	0	0,941	19,652	0
	moyenne	0,92436	1,50701	2,29093	2,57651	0,4705	12,12088	1,25739
MSaé Ø métaux	échantillon 1	0,776172	0	1,13308	0	0	1,0847	0
	échantillon 2	0	0	0	0	0,475	0	0
	moyenne	0,388086	0	0,56654	0	0,2375	0,54235	0

Tableau 8 : Résultats de l'analyse de la concentration des oligo-éléments par ICP-AES des milieux TSB, MSaé avec sels de métaux et MSaé sans ajout de métaux.

Les extraits de levure et les peptones contiennent également des teneurs en zinc et en fer de l'ordre de 100 fois plus élevées que les autres métaux. Au contraire, les autres éléments utilisés dans les milieux de culture complexes ne contiennent que des traces de métaux. On peut en conclure que les peptones et extraits de levure sont les sources d'oligo-éléments dans les milieux complexes, et que le fer et zinc sont présents en concentration beaucoup plus forte.

2) Optimisation des concentrations suite aux analyses effectuées

Les résultats des mesures par ICP-AES montrent que les concentrations de fer et zinc sont plus élevées que les autres oligo-éléments dans les milieux complexes. Ainsi, la concentration d'oligo-éléments a été augmentée afin d'obtenir des concentrations proches des milieux complexes. Les concentrations du cobalt, du cuivre, du manganèse, du molybdène et du nickel ont été fixées à 10 µg/L. Afin de compenser la faible quantité de fer obtenue par rapport à la quantité désirée à incorporer dans le milieu, la quantité de fer a été multipliée non pas par 40 mais par 100, tout comme le zinc, soit 1 mg/L. La nouvelle formulation des deux milieux synthétiques, nommés respectivement MSAé II et MSana II a été testée. La **figure 37** montre la détection visuelle du trouble dû à la croissance des souches dans le milieu TSB MSAé et MSAé II.

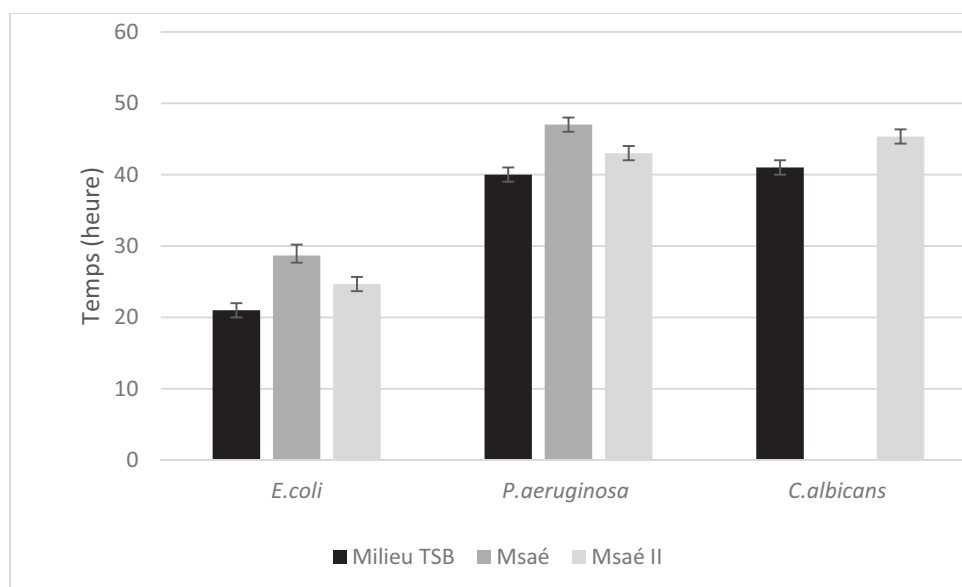


Figure 37 : Détection visuelle du début de croissance des souches *E. coli*, *P. aeruginosa* et *C. albicans* dans les milieux TSB, MSAé et MSAé II

Les résultats indiquent que les souches se développent plus tôt dans la nouvelle formulation, et *C. albicans* est capable de croître. Pour le milieu MSana II, les résultats sont identiques à MSana, *E. coli* se développe dans le même laps de temps et *C. sporogenes* ne se développe

pas. Suite à cette série de tests, les concentrations des milieux MSaé II et MSana II ont été retenues.

Par la suite, des gammes de concentrations plus élevées calculées sur le pourcentage de chaque oligo-élément présent dans les sels ont également été réalisées. Les résultats n'ont pas montré de différences significatives sauf pour le fer : des gammes de concentrations de sulfate de fer allant de 1 mg/L à 3 mg/L ont été effectuées. Les résultats ont indiqué que selon la concentration de fer, certains micro-organismes comme *B. subtilis* ou *P. aeruginosa* se comportaient de manière différente. Le **tableau 9** représente la croissance des bactéries selon l'apparition d'un trouble dans le milieu de culture. Même si la détection visuelle n'a pas permis de différencier de manière précise la croissance d'*E. coli* dans les différents milieux, cette bactérie ne semble pas ou très peu affectée par les différentes concentrations de fer. *P. aeruginosa* se développe plus rapidement dans des concentrations de 2 et 3 mg/L de sulfate de fer mais une concentration de 1,5 mg/L permet d'obtenir une croissance satisfaisante. La principale différence est observée chez *B. subtilis* qui se développe jusqu'à 20 heures plus tôt à une concentration de 1,5mg/L par rapport aux autres concentrations

Temps (heure)		24h	30h	56h	74h	114h	138h
Souches/milieux							
<i>E.coli</i>							
TSB		+	+++	+++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1mg/L	-	++	+++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1,2mg/L	-	++	+++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1,5mg/L	-	++	+++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 2mg/L	-	++	+++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 3mg/L	-	++	+++	+++	+++	+++
<i>P.aeruginosa</i>							
TSB		-	-	++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1mg/L	-	-	-	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1,2mg/L	-	-	+/-	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1,5mg/L	-	-	+	+++	+++	+++
MSaé	Fe 2mg/L	-	-	++	+++	+++	+++
MSaé	Fe 3mg/L	-	-	++	+++	+++	+++
<i>B.subtilis</i>							
TSB		-	-	+	+++	+++	+++
MSaé	Fe 1mg/L	-	-	-	-	+	+++
MSaé	Fe 1,2mg/L	-	-	-	-	++	+++
MSaé	Fe 1,5mg/L	-	-	+	+++	+++	+++
MSaé	Fe 2mg/L	-	-	-	-	++	+++
MSaé	Fe 3mg/L	-	-	-	-	+	+++

Tableau 9 : Croissance de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis* en présence de différentes concentrations de fer. Signification des symboles : - absence de croissance ; +/- début de croissance ; + léger trouble ; ++ trouble ; +++ trouble opaque.

De ce fait, la concentration de 1,5 mg/L de fer a été retenue et testée sur le panel de micro-organismes. Les résultats étant satisfaisants, cette concentration a été validée et utilisée pour la suite de l'élaboration des milieux synthétiques.

c) *Formulation finale des oligo-éléments*

Suite à ces essais, la formulation actuelle en oligo-éléments dans les milieux synthétiques aérobie et anaérobie est la suivante :

$\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 10 $\mu\text{g/L}$; CoCl_2 : 10 $\mu\text{g/L}$; $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 10 $\mu\text{g/L}$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1,5 mg/L ;
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 10 $\mu\text{g/L}$; $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 10 $\mu\text{g/L}$; ZnCl_2 : 1 mg/L.

d) *Conclusion/Discussion*

Cette étude a révélé que la concentration des différents oligo-éléments variait fortement dans les milieux complexes. L'imitation de ces concentrations dans les milieux synthétiques n'a pas permis d'obtenir les meilleurs résultats de croissance. Ces concentrations ont été modifiées, notamment celle du fer, afin d'améliorer la croissance des micro-organismes, montrant ainsi qu'une simple imitation des milieux complexes n'est pas forcément la meilleure solution pour l'élaboration d'un milieu synthétique.

IV. Les acides aminés

La détermination de la composition en acides aminés (aa) a représenté l'une des parties les plus longues et conséquente dans l'élaboration des milieux. Un mélange commercial a en premier lieu été évalué. Les résultats n'étant pas satisfaisants, le recours à l'analyse UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) de peptones ainsi que l'étude des besoins spécifiques de certaines souches se sont avérées nécessaires.

a) *Evaluation d'un mélange commercial d'acides aminés prêt à l'emploi*

Un mélange d'acides aminés, commercialisé par Sigma©, a été utilisé lors de la réalisation des premiers milieux synthétiques (**figure 38**). Son utilisation présentait deux

Components

The following components are included in the amino acid standard:

- L-Alanine
- Ammonium chloride
- L-Arginine
- L-Aspartic acid
- L-Cystine
- L-Glutamic acid
- Glycine
- L-Histidine
- L-Isoleucine
- L-Leucine
- L-Lysine
- L-Methionine
- L-Phenylalanine
- L-Proline
- L-Serine
- L-Threonine
- L-Tyrosine
- L-Valine

Other Notes

Amino acids in this standard are 2.5 μ moles per mL in 0.1 N HCl, except L-cystine at 1.25 μ moles per mL.

Figure 38 : Composition en acides aminés du mélange commercialisé par Sigma© (www.sigmaldrich.com). Dix-sept acides aminés sont présents dans ce kit.

avantages : un gain de temps de préparation et la dissolution complète de l'ensemble des acides aminés.

La concentration des acides aminés correspond en moyenne à 325 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sauf la L-cystine dont la concentration est de 162,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. 500 μl du mélange était utilisé pour un litre de milieu synthétique, soit en moyenne une concentration de 162,5 $\mu\text{g}/\text{aa}$ et 81,25 μg pour la L-cystine. Les performances de ces milieux n'étaient pas satisfaisantes car certains micro-organismes ne se développaient pas et la croissance des autres était fortement retardée. Pour résoudre ce problème, des gammes de concentrations en acides aminés ont été réalisées notamment avec *E. coli*, bactérie possédant les voies de synthèses de tous les acides aminés. De ce fait, les acides aminés n'étant pas nécessaires à sa croissance, les différences de croissance obtenues selon les différentes concentrations de ces molécules donnent une idée des quantités nécessaires à l'optimisation de sa croissance. La **figure 39** montre la croissance de *E. coli* dans du MSaé contenant différentes concentrations du mélange commercial d'acides aminés. Les volumes testés étaient de 200 μl , 2 ml et 5 ml soit respectivement 65 μg , 650 μg et 1,62 mg de chaque d'acide aminé par litre.

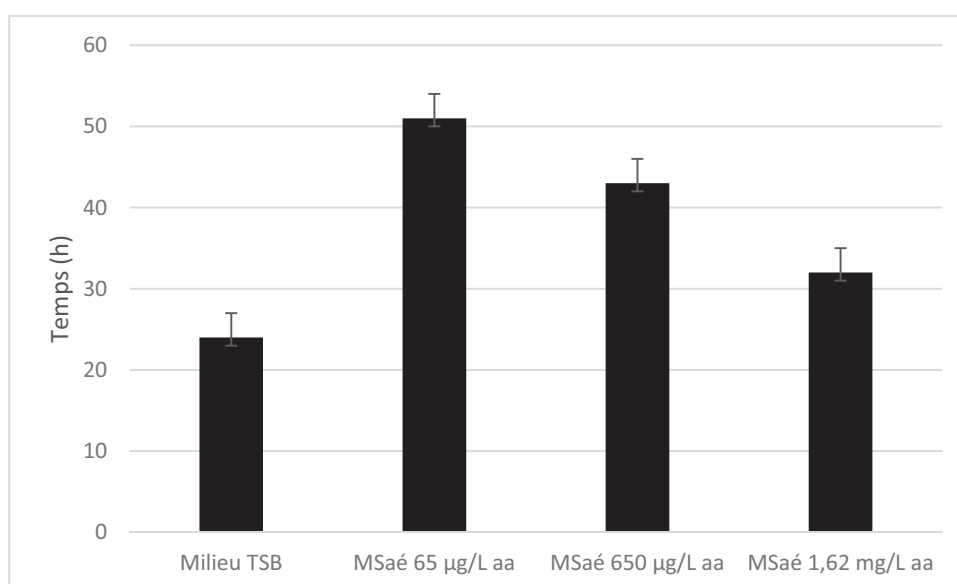


Figure 39 : Effet de la concentration en acides aminés sur la croissance d'*E. coli* par détection visuelle.

Les résultats mettent en évidence l'importance de la quantité d'acides aminés à incorporer dans les milieux synthétiques. *E. coli* met cinquante heures à se développer dans le milieu synthétique contenant une très faible quantité d'acides aminés. Si cette concentration augmente, la croissance devient plus rapide allant de 43 heures pour une concentration de 650 µg/L à 32 heures pour une concentration de 1,62 mg/L.

Cependant, ces concentrations étaient encore trop faibles induisant une croissance ralentie pour la plupart des micro-organismes et ne permettaient pas la croissance de *C. sporogenes*. La quantité d'acides aminés nécessaire dans les milieux synthétiques devenant trop importante, il a été décidé de ne plus utiliser de mélanges commerciaux ayant des teneurs trop faibles. Les acides aminés ont alors été incorporés dans les milieux un par un permettant également de ne pas être restreint au niveau de la composition.

b) *Importance de la dissolution des acides aminés*

Avant d'étudier la quantité d'acides aminés nécessaire à la croissance des bactéries, il est important d'obtenir la meilleure dissolution des acides aminés afin de garantir leur disponibilité pour les micro-organismes mais également d'obtenir un milieu limpide.

1) Tests sur la solubilité des acides aminés

La plupart des acides aminés sont solubles dans l'eau. De ce fait, pour les premières préparations de solutions mères, tous les acides aminés étaient mélangés ensemble. Cela générait des précipités qui ne disparaissaient pas même après autoclavage. Afin de trouver la meilleure préparation de solution mère, la dissolution de 100 mg de chaque acide aminé a été testée dans de l'eau purifiée. Si l'acide aminé n'était pas totalement soluble dans l'eau, les quantités d'acide chlorhydrique (HCl) ainsi que de soude (NaOH) nécessaires à la dissolution ont été déterminées dans le but d'obtenir la solution mère la plus simple à préparer. Le **tableau 10** récapitule les résultats obtenus. On observe que 5 acides aminés ne se dissolvent

Acides Aminés	Concentration mg	Quantité H ₂ O (ml)	HCl 3N (ml ajouté)	NaOH 1N (ml ajouté)
DL-alanine	100	5	x	x
DL-isoleucine	100	10	x	x
DL-phénylalanine	100	10	X	x
DL-sérine	100	10	x	x
DL-thréonine	100	5	x	x
DL-valine	100	10	x	x
Glycine	100	5	x	x
L-acide aspartique *	100	10	2,3	1,1
L-acide glutamique *	100	10	0,8	1,2
L-arginine	100	5	x	x
L-cystéine	100	5	x	x
L-cystine *	100	10	4,2	1
L-histidine	100	10	x	x
L-hydroxyproline	100	5	x	x
L-leucine	100	10	x	x
L-lysine	100	5	x	x
L-méthionine	100	10	x	x
L-proline	100	5	x	x
L-Tryptophane *	100	10	1,1	1,4
L-tyrosine *	100	10	1,7	1

Tableau 10 : Dissolution de 100 mg d'acides aminés dans l'eau. Les acides aminés représentés avec un * ont été dissous soit dans du HCl soit dans du NaOH aux concentrations indiquées.

pas dans l'eau. Il s'agit du L-acide aspartique, du L-acide glutamique, du L-tryptophane, de la L-tyrosine et de la L-cystine. Ils peuvent tous être dissous dans de l'acide chlorhydrique ou de la soude.

Afin de trouver la meilleure préparation, différentes dilutions d'acide chlorhydrique, de soude ou même d'eau ont été testées à différentes températures et après autoclave. Il a été observé que la solution des cinq acides aminés dissous dans la soude ou l'eau et chauffée au-dessus de 60 degrés devenait brunâtre. La **photo 1** montre l'état de brunissement des différents milieux synthétiques contenant les différentes dissolutions d'acides aminés après autoclavage. La dissolution par acide chlorhydrique est la seule à donner une solution limpide.

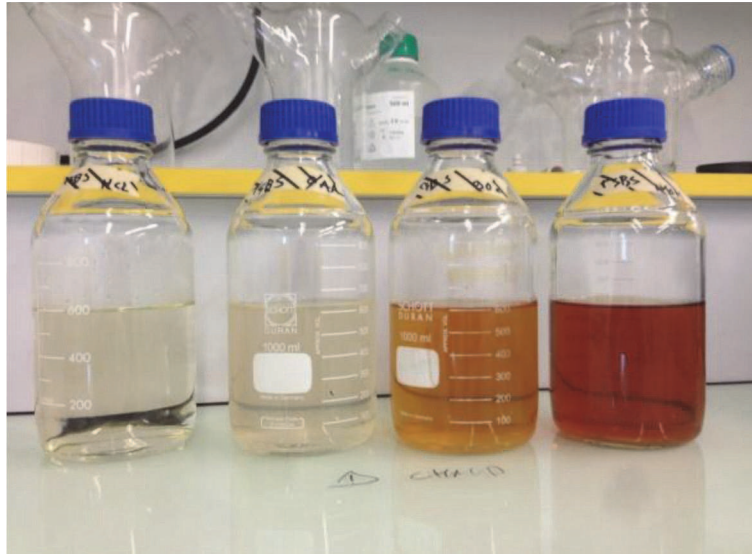


Photo 1 : Résultat des dissolutions des cinq acides aminés difficiles à dissoudre mélangés au milieu MSaé, après autoclavage. En partant de la droite, la première bouteille contient les aa dissous avec la soude, la seconde les aa non dissous, la troisième le milieu sans aa et la dernière les aa dissous avec l'acide chlorhydrique.

Il est cependant difficile d'évaluer l'impact d'une forte concentration d'HCl sur les acides aminés. De ce fait, la plus petite concentration d'acide chlorhydrique sera ajoutée à la solution mère des cinq acides aminés et sera chauffée à 60°C.

c) Estimation de la quantité nécessaire en acides aminés

Pour chaque acide aminé, des gammes de concentrations ont été réalisées de 200 mg/L à 1 g/L. Les résultats (non montrés) étaient difficiles à interpréter car les différences de croissance n'étaient pas évidentes à évaluer entre les souches testées. Cependant, pour chaque test, *C. sporogenes* ne se développait pas dans le milieu synthétique anaérobie. Afin de déterminer les besoins nutritifs de cette bactérie, la composition en acides aminés a été modifiée afin d'être identique à celle d'un milieu synthétique développé pour la croissance de *Clostridium perfringens* (Riha and Solberg, 1971) (voir **tableau 11**). Il est intéressant de noter que dans ce milieu, la cystéine est remplacée par de la cystine, molécule constituée de deux

acides aminés du milieu	Quantité (mg/l)
DL-alanine	500
L-arginine	5000
L-aspartic acid	500
L-cystine	400
Glycine	500
L-acide glutamique	1000
L-histidine	250
L-hydroxy-proline	200
DL-isoleucine	500
L-lysine	500
L-leucine	500
DL-méthionine	350
L-proline	250
DL-phenylalanine	500
DL-sérine	750
DL-threonine	500
L-tryptophan	250
L-tyrosine	250
DL-valine	375

Tableau 11 : composition en acides aminés du milieu synthétique pour *C. sporogenes* (Riha and Solberg, 1971)

cystéines reliées entre elles par un pont disulfure. Les groupements thiols de la cystéine ne sont pas très stables et peuvent facilement s'oxyder avec un autre groupement thiol d'une autre cystéine. De ce fait une solution de cystéine aura tendance à former de la cystine. L'utilisation de la cystine permet d'utiliser une plus faible quantité de molécules qui restent stable dans le temps. La cystine une fois incorporée par la bactérie sera clivée et fournira deux molécules de cystéine. Les résultats ont montré que *C. sporogenes* se développait en moins de 40 heures (voir **tableau 12**). Ces quantités d'acides aminés ont été également testées sur d'autres souches et n'ont pas montré d'impact négatif sur leur croissance par rapport à l'ancienne formulation d'acides aminés (données non montrées).

Souche/Milieu \ Temps(h)	16h	22h	30h	40h	48h
<i>C. sporogenes</i>					
FTM	-	+	+++	+++	+++
MSana	-	-	-	+	+++

Tableau 12 : Croissance de *C. sporogenes* dans le milieu FTM en comparaison avec le MSana contenant la nouvelle formulation d'acides aminés.

1) Analyse de la concentration des acides aminés par UPLC-MS

Afin de déterminer de manière plus précise la concentration en acides aminés présents dans les milieux TSB et FTM, ces derniers, ainsi que différentes versions du MSaé, ont été analysés par UPLC-MS AccQTag (moyen de dérivation des acides aminés). La figure 40 indique les aires obtenues lors de l'analyse du milieu TSB, FTM et MSaé. Pour chaque acide aminé, une gamme étalon a été réalisée permettant d'associer à une concentration donnée, un temps de rétention spécifique.

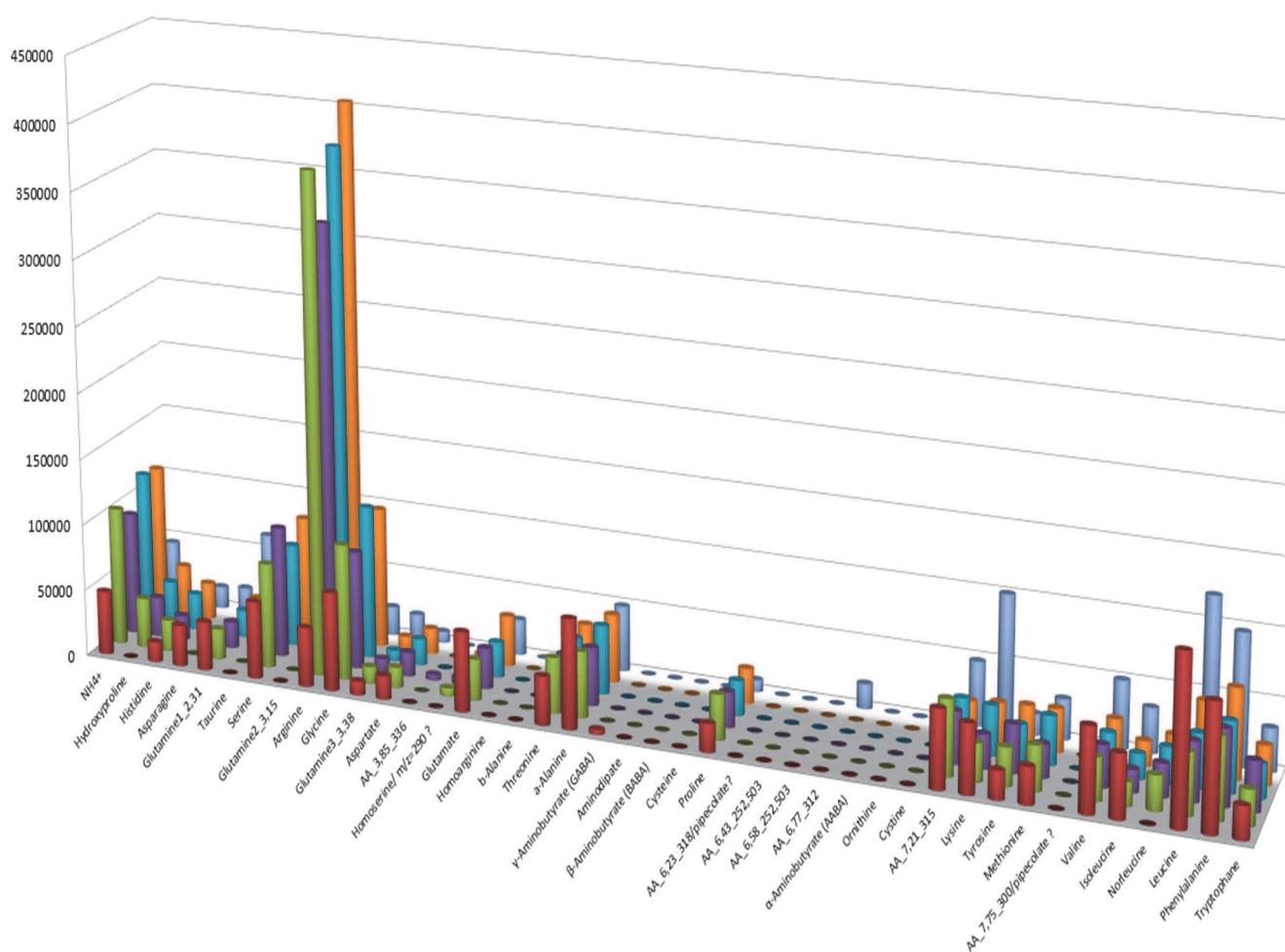


Figure 40 : Quantités relatives (unité abstraite) des acides aminés (aa) déterminées dans différents milieux de culture par UPLC. En rouge sont représentés les acides aminés du TSB ; en vert : MSaé aa dissous à 90°C ; en violet : MSaé aa dissous au NaOH ; en bleu : MSaé aa dissous à l'HCl ; en orange : MSaé aa + MgSO4 1 g/L ; en bleu clair FTM

Quatre milieux MSaé ont été analysés : le premier milieu contenait les acides aminés dissous à 90°C, le second les acides aminés dissous à la soude, le troisième les acides aminés dissous à l'HCl et le dernier contenait les acides aminés dissous à l'HCl + 1 g/l de MgSO₄, suspecté de précipiter avec les acides aminés. Les résultats obtenus (**Annexe 4**) montrent que les proportions des acides aminés dissous de différentes manières sont assez proches. Les données sont assez éloignées de la quantité d'acides aminés incorporés dans les milieux. Il est cependant possible de faire un ratio afin d'estimer les quantités présentes dans le milieu TSB. Le calcul a été effectué à partir des données du milieu MSaé contenant les acides aminés dissous à l'HCl. Les concentrations estimées en acides aminés du TSB ont été incorporées aux milieux synthétiques aérobies appelés MSaé aa UPLC1 et MSaé aa UPLC2. Si les acides aminés n'ont pas été détectés, MSaé aa UPLC1 contient la même quantité d'acides aminés que MSaé et MSaé aa UPLC2 le double (voir partie suivante) comme pour la cystine. Notons que la gamme étalon de la phénylalanine n'a pas pu être réalisée, ne permettant pas d'associer la quantité relative de l'acide aminé à une concentration (confère annexe4).

2) Comparaison de milieux avec acides aminés à un milieu contenant leurs précurseurs

Les précurseurs des voies de synthèse des acides aminés ont également été testés. En effet, si l'incorporation des précurseurs permet d'obtenir les mêmes performances que l'ajout de tous les acides aminés, la formulation des milieux serait simplifiée. Certains acides aminés et le pyruvate sont au départ des voies de synthèse des autres acides aminés (voir **figure 11**). En effet, l'acide aspartique est le précurseur de l'asparagine, la thréonine, l'isoleucine, la méthionine et la lysine. L'acide glutamique, quant à lui, est le précurseur de la glutamine, de la proline et de l'arginine. La sérine est au départ des voies de synthèse de la glycine et de la cystéine. Enfin, le pyruvate est le précurseur de l'alanine, la lysine, l'isoleucine, la valine et la leucine. Seuls la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane n'ont pas de précurseurs. Différentes concentrations de ces précurseurs ont remplacé la concentration en acides aminés du MSaé. La composition en aa des milieux MSaé aa P1 et MS aa P2 est représentée dans le **tableau 13**.

Acide aminés \ Milieux	MSaé mg/L	MSaé aa UPLC1 mg/L	MSaé aa UPLC2 mg/L	MSaé aa P1 mg/L	MSaé aa P2 mg/L
DL-alanine	500	797	797	0	0
DL-isoleucine	500	1262	1262	0	0
DL-phénylalanine	500	500	1000	1000	750
DL-sérine	750	564	564	0	0
DL-thréonine	500	465	465	0	0
DL-valine	375	774	774	0	0
Glycine	500	321	321	0	0
L-acide aspartique	500	446	446	1000	500
L-acide glutamique	1000	2	2	1000	1000
L-arginine	5000	0,5	0,5	0	0
L-Asparagine	0	250	250	0	0
L-cystine	400	400	800	0	0
L-histidine	250	250	250	0	0
L-hydroxyproline	200	0	0	0	0
L-leucine	500	1559	1559	0	0
L-lysine	500	696	696	0	0
L-méthionine	350	266	266	0	0
L-proline	250	203	203	1000	500
L-Tryptophane	250	241	241	1000	250
L-tyrosine	250	200	200	1000	250
Pyruvate	0	0	0	1000	1000

Tableau 13: Composition en acides aminés de différents milieux synthétiques. Le milieu MSaé est le milieu synthétique avec la concentration en aa de référence. Les milieux MSaé aa UPLC1 et 2 ont la formulation des acides aminés du TSB déterminé par UPLC MS. Les Milieux MSaé aa P1 et P2 ne contiennent que les aa précurseurs et du pyruvate permettant la synthèse de tous les acides aminés.

Ces milieux ont été testés sur quatre bactéries. Les résultats présentés dans le **tableau 14** indiquent que les performances du milieu MSaé semblent meilleures pour *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. subtilis*. Ces bactéries se développent toutes dans les milieux MSaé aa UPLC mais avec un léger retard pouvant être de plusieurs heures chez *B. subtilis*. Les précurseurs d'acides aminés induisent une croissance retardée d'une vingtaine d'heures chez *P. aeruginosa* et ne permettent pas la croissance de *B. subtilis* au terme de 70 heures. *M. extorquens* ne se développe que dans le TSB après 145 heures. Ces résultats suggèrent que le milieu MSaé contient la formulation en acides aminés offrant la meilleure performance. Cette composition ainsi que ces concentrations ont été retenues pour la suite des expériences.

Souches/Milieux		Temps (heure)								
		20h	27h	29h	42h	48h	52h	60h	70h	145h
<i>E.coli</i>										
	TSB	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	MSaé	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	MSaé aa UPLC1	-	-	+/-	++	+++	+++	+++	+++	+++
	MSaé aa UPLC2	-	-	+/-	++	+++	+++	+++	+++	+++
	MSaé aa p1	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
	MSaé aa p2	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++
<i>P.aeruginosa</i>										
	TSB	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	MSaé	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
	MSaé aa UPLC1	-	-	-	-	+/-	+	+++	+++	+++
	MSaé aa UPLC2	-	-	-	-	+/-	+	+++	+++	+++
	MSaé aa p1	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+++
	MSaé aa p2	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+++
<i>B.subtilis</i>										
	TSB	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	MSaé	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
	MSaé aa UPLC1	-	-	-	-	+/-	+	+++	+++	+++
	MSaé aa UPLC2	-	-	-	-	+/-	+	+++	+++	+++
	MSaé aa p1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSaé aa p2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M.extorquens</i>										
	TSB	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	MSaé	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSaé aa UPLC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSaé aa UPLC2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSaé aa p1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MSaé aa p2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 14 : Performance des milieux synthétiques dont la composition en aa est décrite tableau 13.

d) Formulation finale

La formulation retenue en acides aminés est la suivante :

DL-Alanine : 500 mg/L ; L-Arginine : 5 g/L ; Glycine : 500 mg/L ; Histidine : 250 mg/L ; L-Hydroxyproline : 200 mg/L ; L-Isoleucine : 500 mg/L ; L-Lysine : 500 mg/L ; L-Leucine : 500 mg/L ; DL-Méthionine : 350 mg/L ; L-Proline : 250 mg/L ; DL-Phénylalanine : 500 mg/L ; DL-Serine : 750 mg/L ; DL-Thréonine : 500 mg/L ; DL-Valine : 375 mg/L ; L-Acide aspartique : 500 mg/L ; L-Aspartique glutamique : 1 g/L ; L-Tryptophane : 50 mg/L ; L-Tyrosine : 250 mg/L ; L-Cystine : 400 mg/L.

e) *Conclusion/Discussion*

Afin de trouver la meilleure manière d'incorporer les acides aminés dans les milieux, l'ensemble des acides aminés ainsi que leurs précurseurs ont été testés à différentes concentrations. Un retard de croissance évident est apparu dans les milieux ne contenant que les précurseurs des acides aminés. Les acides aminés insolubles dans l'eau sont à présent dissout dans de l'acide chlorhydrique afin d'obtenir un milieu final limpide. Une autre possibilité d'incorporer des acides aminés dans le milieu serait l'ajout de peptides. En effet, les acides aminés présents dans les milieux complexes sont majoritairement retrouvés sous forme de peptides et ne sont pas à « l'état libre » comme ils pourraient l'être dans les milieux synthétiques. De ce fait, l'assimilation de ces acides aminés par les micro-organismes n'est pas la même. En effet, les peptides vont être incorporés par des transporteurs différents, générant un métabolisme bactérien pouvant être également différent. L'ajout de peptides dans les milieux synthétiques est une piste qui n'a pas été explorée mais qui mérite qu'on lui porte une attention particulière. La composition des peptides issus des peptones et des extraits de levure est probablement totalement aléatoire. Il est donc impossible de reproduire la composition de ces peptides. Cela laisse alors une multitude de possibilités dans le choix du nombre et de la nature des acides aminés composants les peptides à incorporer au milieu. Obtenir la composition optimale semble de ce fait utopique. Il serait cependant intéressant d'évaluer dans un premier temps les performances de l'ajout de di ou tripeptides dans le milieu. Un mélange de différentes tailles de peptides est également envisageable et refléterait mieux la composition des milieux complexes.

V. Les bases azotées

La concentration en bases azotées, précurseurs des acides nucléiques, n'a pas été quantifiée lors des analyses des milieux complexes. De ce fait, la réalisation de tests croisés (variation de la concentration d'une ou plusieurs bases azotées à la fois) s'est révélée être la seule méthode permettant de formuler la composition pour ces molécules.

a) *Sélection des bases azotées*

Les premiers milieux synthétiques réalisés contenaient les cinq bases azotées à des concentrations de 10 mg/L. Aucune souche ne se développait dans ces milieux. Des tests sur chaque base ont été réalisés faisant varier les concentrations des bases azotées une par une, en fixant les autres à 10 mg/L. Il s'est avéré que seuls les milieux dépourvus de cytosine ou à 1 mg/L permettaient la croissance de *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les concentrations de 5 et 10 mg/L ne permettent pas la culture suggérant que ces concentrations sont inhibitrices dans le milieu de culture synthétique. Les autres bases puriques ont également été évaluées et la xanthine a permis d'obtenir une meilleure croissance chez *E. coli*. Par la suite, la cytosine a été testée sur tous les micro-organismes à une concentration de 1 mg/L et n'a pas montré d'effet toxique. Cette concentration n'a pas été modifiée par la suite. La xanthine a également été retenue pour être ajoutée aux milieux synthétiques. Les concentrations des bases azotées sont restées fixées à 10 mg/L.

b) *Impact de la dissolution des bases azotées*

Les bases azotées contiennent des hétérocycles aromatiques pouvant expliquer leur mauvaise dissolution dans l'eau exceptée la cytosine qui se dissout jusqu'à une concentration de l'ordre de 10 mg/ml. Comme pour les acides aminés, plusieurs dissolutions ont été réalisées (**tableau 15**) afin de trouver le meilleur compromis entre la concentration du solvant et la durée de chauffage à 60°C.

Expérience		1	2	3
Base azotée				
A	Adénine	4,8 ml H ₂ O + 200 µl HCL	4,9 ml H ₂ O + 100 µl HCL 30 sec à 60 °C	4,95 ml H ₂ O + 50 µl HCL 20 min à 60 °C
G	Guanine	1,5 ml H ₂ O + 3,5 ml HCL 16 min à 60 °C	2,5 ml H ₂ O + 2,5 ml HCL 22 min à 60 °C	3,5 ml H ₂ O + 1,5 ml HCL 29 min à 60 °C
T	Thymine	4,5 ml H ₂ O + 500 µl NaOH	4,7 ml H ₂ O + 300 µl NaOH 30 sec à 60 °C	4,8 ml H ₂ O + 200 µl NaOH 40 sec à 60 °C
U	Uracile	4,5 ml H ₂ O + 500 µl NaOH	4,7 ml H ₂ O + 300 µl NaOH 2 min à 60 °C	4,8 ml H ₂ O + 200 µl NaOH 5 min à 60 °C
X	Xanthine	3,5 ml H ₂ O + 1,5 ml NaOH	3,8 ml H ₂ O + 1,2 ml NaOH 50 sec à 60 °C	4 ml H ₂ O + 1 ml NaOH 3 min à 60 °C

Expérience		4	5
Base azotée			
A	Adénine	4,98 ml H ₂ O + 20 µl HCL >1H 60 °C	5 ml H ₂ O dissolution ∅
G	Guanine	4 ml H ₂ O + 1 ml HCL 36 min à 60 °C	4,8 ml H ₂ O + 200 µl HCL dissolution ∅
T	Thymine	4,9 ml H ₂ O + 100 µl NaOH 2 min à 60 °C	4,95 ml H ₂ O + 50 µl NaOH 2 min à 60 °C
U	Uracile	4,9 ml H ₂ O + 100 µl NaOH 10 min à 60 °C	4,95 ml H ₂ O + 50 µl NaOH 15min à 60 °C
X	Xanthine	4,2 ml H ₂ O + 800 µl NaOH 4 min à 60 °C	4,5 ml H ₂ O + 500 µl NaOH 17min à 60 °C

Tableau 15 : Solubilisation des bases azotées (100 mg). De 1 à 5, concentrations décroissantes de solvants (HCL, NaOH).

Les meilleurs résultats pour *E. coli* et *C. sporogenes* ont été obtenus avec les milieux utilisant la combinaison des solutions suivantes : U5 + T5 + X5 + A4 + G4 et U4 + T4 + X4 + A3 + G3, soit les solutions contenant les plus faibles doses d'acide ou de base. Les procédures de dissolutions de 100 mg pour chaque base ont été les suivantes :

- Adénine: 100 mg dans 200 µl d' HCL 3N mélangés à 9,8 ml d'eau milliQ
- Guanine: 100 mg dans 4 ml d' HCL 3N mélangés à 6 ml d'eau milliQ
- Uracile: 100 mg dans 200 µl de NaOH 1N mélangés à 9,8 ml d'eau milliQ
- Thymine: 100 mg dans 200 µl de NaOH 1N mélangés à 9,8 ml d'eau milliQ
- Xanthine: 100 mg dans 2 ml de NaOH 1N mélangés à 8 ml d'eau milliQ
- Cytosine: 100 mg dans 10 ml d'eau milliQ

Chaque solution mère est chauffée à 60°C avec agitation pendant environ 30 minutes.

c) Estimation des concentrations en bases azotées par tests croisés

Au cours du développement des milieux, deux gammes de concentrations en bases azotées ont été réalisées. La première gamme comprend les concentrations situées entre 0 à 10 mg/L pour toutes les bases azotées. La croissance d'*E. coli* montre une forte sensibilité suivant les différentes concentrations des bases azotées utilisées comme le montre la **figure 41**. Une concentration en chaque base azotée de 5mg/L donne les meilleurs résultats de croissance chez *E. coli*.

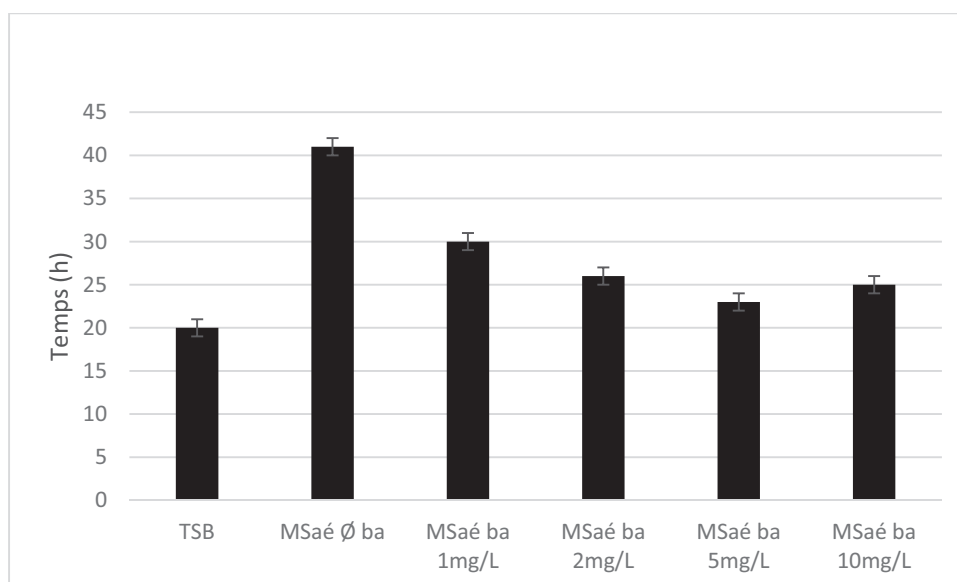


Figure 41 : Croissance d'*E. coli* par détection visuelle dans le milieu MSAé suivant les concentrations des bases azotées.

La seconde gamme consiste à modifier la concentration d'une seule base azotée comme le montre le **tableau 16**. Cette gamme a été testée sur quatre bactéries *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *S. epidermidis*. Les résultats obtenus ne permettent pas de conclure facilement sur les concentrations optimales à utiliser car chacune des bactéries montre un comportement différent. De plus, pour une bactérie donnée, la différence de performance entre les milieux était souvent minime (données non présentées). De ce fait, la concentration en bases azotées retenue a été fixée à 5mg/L pour toutes les bases azotées sauf la cytosine pour laquelle la concentration sera de 1mg/L.

Base azotée	Concentration en mg/L												
Adénine	5	10	5	5	5	5	10	1	5	5	5	5	1
Guanine	5	5	10	5	5	5	10	5	1	5	5	5	1
Uracile	5	5	5	10	5	5	10	5	5	1	5	5	1
Thymine	5	5	5	5	10	5	10	5	5	5	1	5	1
Xanthine	5	5	5	5	5	10	10	5	5	5	5	1	1
Milieu MSaé	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M

Tableau 16 : Gamme de concentration permettant d'évaluer la concentration de chaque base azotée. Chaque colonne représente les concentrations en bases azotées en mg/L d'un milieu synthétique MSaé (A-M). Les concentrations les plus fortes sont surlignées en rouge et les plus faibles en jaune.

d) Formulation finale

Concentration finale de chaque base azotée :

Adénine : 5 mg/L ; Guanine : 5 mg/L ; Uracile : 5 mg/L ; Thymine : 5 mg/L ; Xanthine : 5 mg/L ;
Cytosine : 1 mg/L.

e) Conclusion/Discussion

Les résultats montrent qu'il a été difficile d'estimer précisément la quantité de bases azotées nécessaire. Dans les milieux complexes comprenant des extraits de levure, ces bases sont probablement présentes sous forme de fragment d'ADN ou d'ARN. Pour vérifier cette hypothèse, de l'ADN d'*E.coli* a été ajouté aux milieux synthétiques contenant ou non les bases azotées. Les résultats ont été décevants car il n'y a pas eu de croissance dans les milieux ne contenant que l'ADN. De plus, la croissance n'a pas été améliorée dans les milieux contenant déjà les bases azotées. Cependant, cette expérience mérite d'être refaite avec différentes concentrations d'ADN ainsi que de l'ARN afin de valider ces résultats.

VI. Les Vitamines

Il existe 6 classes de vitamines répertoriées sous les noms de A, B, C, D, E et K qui sont fonction de leurs actions au sein d'un organisme. Les bactéries n'utilisent que les classes B, C, E et K. Les vitamines peuvent également être classées en fonction de leur solubilité aqueuse.

a) *Différences de solubilité*

Les vitamines supportent mal la chaleur. La stérilisation par autoclavage n'est donc pas recommandée. De ce fait, toutes les solutions mères de vitamines vont être préparées et stérilisées par filtration.

1) Vitamines hydrosolubles

Les vitamines de la classe B sont classées comme vitamines hydrosolubles. La plupart d'entre elles se dissolvent très bien dans l'eau comme la thiamine (B1), les trois formes de la vitamine B6 qui sont la pyridoxine, la pyridoxamine et le pyridoxal, le pantothénate (B5), la nicotinamide (B3) et la cobalamine (B12). L'acide ascorbique (C) est également totalement hydrosoluble.

2) Vitamines non hydrosolubles

Malgré leur appartenance à la classe B, certaines vitamines ne sont pas totalement hydrosolubles. L'acide para-aminobenzoïque (PABA ; B10) se dissout dans de l'éthanol à 70 % alors que la riboflavine (B2) et la biotine (B8) se dissolvent dans de la soude à 0,1 M (O'Neil, 2013). L'acide folique (B9) adopte un comportement différent. En effet il était recommandé (manuel Merck index) une dissolution dans de l'acide chlorhydrique. Cependant, cette vitamine re-précipite après quelques heures. Nous avons pu établir que l'acide folique ne peut être dissout qu'avec de la soude à 1 M. La solution obtenue est stable. Enfin, la phylloquinone (K1) est une vitamine liposoluble. Elle se dissout mal dans de l'éthanol mais très bien dans de l'acétone.

b) *Identification des vitamines nécessaires à la croissance bactérienne*

Les vitamines ne sont pas nécessaires au développement de *E. coli* ou *B. subtilis*. Elles peuvent cependant influencer de manière positive ou négative la croissance des micro-organismes. Ces deux bactéries ont été choisies pour tester les effets des vitamines sur la croissance. Une troisième bactérie, exigeante du point de vue des vitamines fut ajoutée, *S. epidermidis*.

Les premiers milieux synthétiques (MSaé) étaient composés d'une liste minimale de vitamines à une concentration de 5 mg/L afin de ne fournir que les vitamines indispensables. Des études ont montré les effets des vitamines sur la croissance de *B.vulgatus* (Varel and Bryant, 1974), *C. albicans* (Dumitru *et al.*, 2004) *P. acnes* (Ferguson and Cummins, 1978), *S. aureus* (Mah *et al.*, 1967) et *S. epidermidis* (Hussain *et al.*, 1991). Les vitamines définies suite à l'étude bibliographique ont été incorporées au milieu nommé MSaé I (pour cette partie) afin d'améliorer la croissance du panel. Afin de ne pas ajouter de vitamines non nécessaires, ce milieu synthétique ne contenait pas de pyridoxal ni de pyridoxamine car la plupart des bactéries peuvent convertir la pyridoxine en ces deux vitamines. Cependant, *S. epidermidis* ne semble pas synthétiser les enzymes nécessaires à ces conversions car cette bactérie ne se développait pas dans ce milieu. De ce fait, ces deux vitamines ont été ajoutées au milieu MSaé II. Le **tableau 17** récapitule la composition des milieux.

MSaé	MSaé I	MSaé II
PABA	PABA	PABA
Riboflavine	Riboflavine	Riboflavine
Pantothénate	Pantothénate	Pantothénate
Acide folique	Acide folique	Acide folique
Pyridoxine	Pyridoxine	Pyridoxine
Biotine	Biotine	Biotine
Nicotinamide	Nicotinamide	Nicotinamide
Cobalamine	Cobalamine	Cobalamine
Pyridoxamine	Thiamine	Thiamine
Pyridoxal	Phylloquinone	Phylloquinone
	Acide ascorbique	Acide ascorbique
		Pyridoxamine
		Pyridoxal

Tableau 17 : Composition en vitamines des milieux synthétiques MSaé, MSaé I et MSaé II. Les vitamines en bleu sont uniquement présentes dans le milieu MSaé et MSaé II. Les vitamines en vert ne sont présentes que dans les milieux MSaé I et MSaé II.

Afin de justifier l’ajout de vitamines dans les milieux synthétiques, les milieux MSaé, MSaé I et II ont été comparés à un milieu synthétique ne contenant pas de vitamines ainsi qu’au milieu TSB. Les résultats sont représentés dans la **figure 42** et montrent que *E. coli* se développe plus rapidement dans le milieu TSB et ne semble pas influencée par l’absence ou

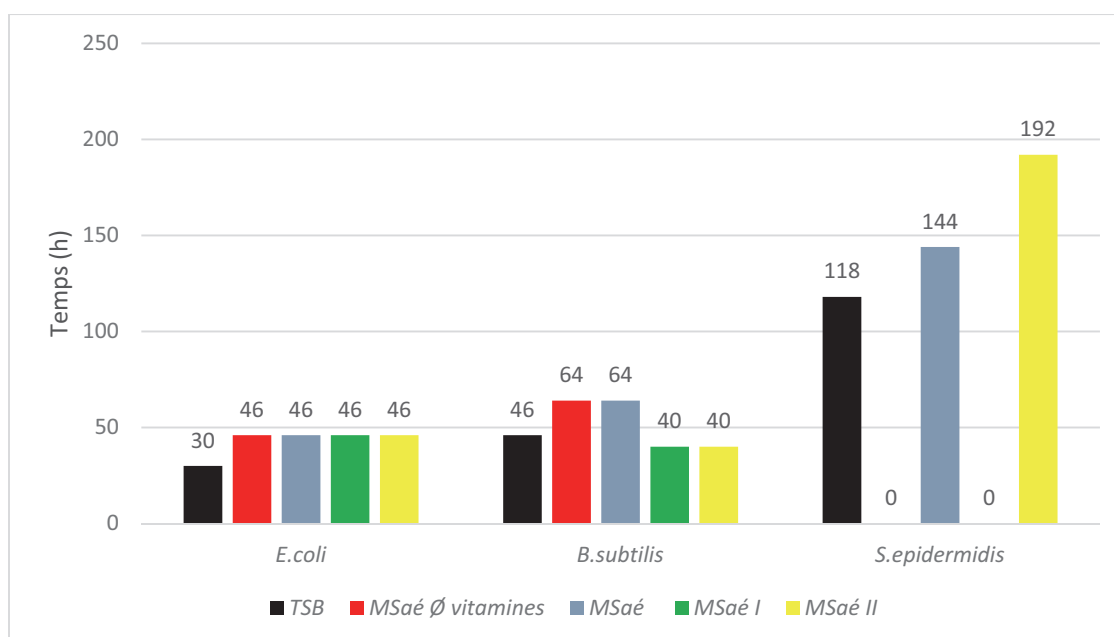


Figure 42 : Croissance d’*E. coli*, *B. subtilis* et *S. epidermidis* par détection visuelle dans des milieux synthétiques contenant des compositions différentes en vitamines.

par les différentes compositions en vitamines des milieux synthétiques. *B. subtilis* se développe avec un léger retard dans le milieu sans vitamine ainsi que dans le milieu MSaé. Cependant, les vitamines présentes dans les milieux MSaé I et MSaé II améliorent sa croissance par rapport au milieu TSB. *S. epidermidis* quant à lui ne se développe pas dans le milieu ne contenant pas de vitamines ainsi que dans le milieu synthétique ne contenant pas de pyridoxal et de pyridoxamine (MSaé I). Le développement bactérien devient visible après 144h dans le milieu MSaé et 192h dans le milieu MSaé II. Cette différence peut s'expliquer par la concentration en vitamines (voir partie suivante). Cette expérience a mis en évidence l'importance des vitamines dans les milieux synthétiques. Elles ne sont pas nécessaires à toutes les bactéries mais peuvent améliorer leur croissance comme c'est le cas chez *B. subtilis*. A l'opposé, *S. epidermidis* requiert des vitamines pour se développer. Au vu des résultats, le milieu MSaé II a été retenu. Il nécessitait cependant des améliorations notamment au niveau de la concentration en vitamines.

c) *Détermination de la concentration en vitamines par comparaison des concentrations présentes dans les peptones et extraits de levure*

Comme il est assez difficile d'analyser la composition en vitamine du milieu TSB, les concentrations des milieux synthétiques vont être directement inspirées par la teneur en vitamines des peptones de caséine et de soja référencée dans le manuel de microbiologie Merck (voir **Annexe 5**) qui ont été quantifiées par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP). Le milieu TSB contient 17 g d'hydrolysate de caséine et 3 g de peptone de soja. De ce fait, il suffit de calculer la concentration de chaque vitamine à la fois dans les 17 g d'hydrolysate de caséine mais également dans les 3 g de peptone de soja et d'additionner les deux. Pour les vitamines non répertoriées dans le manuel, la moyenne des autres concentrations de vitamines (170 µg/L) a été utilisée. Le **tableau 18** indique les concentrations en vitamines des milieux MSaé et MSaé II.

Milieux \ Vitamines	MSaé	MSaé II	MSaé III
Thiamine	-	30 µg/L	300 µg/L
Pyridoxine	5 mg/L	90 µg/L	900 µg/L
Pyridoxamine	5 mg/L	90 µg/L	900 µg/L
Pyridoxal	5 mg/L	90 µg/L	900 µg/L
Panthoténate	5 mg/L	280 µg/L	2,8 mg/L
Nicotinamide	5 mg/L	560 µg/L	5,6 mg/L
Cobalamine	5 mg/L	260 µg/L	2,6 mg/L
Acide ascorbique	-	170 µg/L	1,7 mg/L
Riboflavine	5 mg/L	100 µg/L	1 mg/L
PABA	5 mg/L	170 µg/L	1,7 mg/L
Biotine	5 mg/L	5 µg/L	50 µg/L
Acide folique	5 mg/L	11 µg/L	110 µg/L
Phylloquinone	-	170 µg/L	1,7 mg/L

Tableau 18 : Concentrations en vitamines des milieux MSaé, MSaé II et MSaé III. Le signe - signifie l'absence de la vitamine dans le milieu.

Comme le montre la composition du milieu MSaé II, les calculs effectués précédemment ont donné des concentrations en vitamines assez faibles par rapport à celles du milieu MSaé. De plus, les expériences de la **figure 42** ont montré que le MSaé II avait de moins bonnes performances en termes de vitesse de croissance chez *S. epidermidis* par rapport au MSaé, milieu qui a une concentration beaucoup plus élevée en vitamines. Pour résoudre ce problème, une gamme de concentrations en vitamines a été réalisée sur le milieu MSaé II et a permis de montrer que multiplier par dix la concentration de chaque vitamine (MSaé III) offrait de meilleures performances (**figure 43**).

Le milieu MSaé III offre les meilleures performances des différents milieux synthétiques et doit contenir l'ensemble des vitamines nécessaires au panel. La formulation en vitamines du milieu MSaé III a donc été retenue pour la suite du développement des milieux synthétiques.

Quelques tests sur des vitamines supplémentaires ont été effectués en utilisant le tocophérol, le rétinol et le cholécalciférol connus pour leurs actions antioxydantes ou leur nécessaire présence chez les animaux. Ces vitamines n'ont pas eu d'influence sur la croissance des bactéries testées (données non montrées).

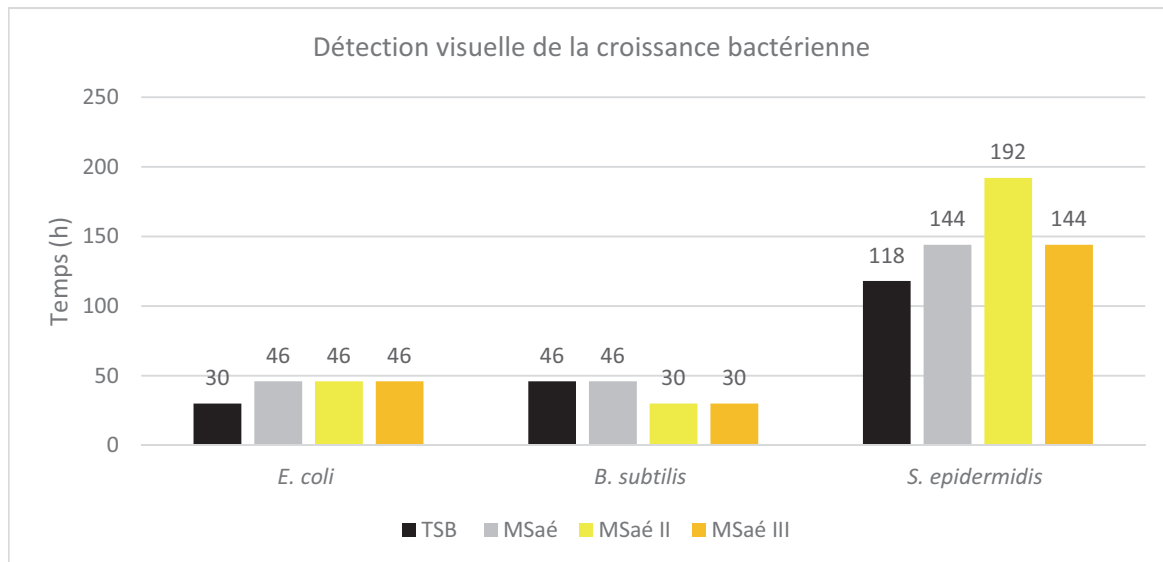


Figure 43 : Croissance de *E. coli*, *B. subtilis* et *S. epidermidis* dans les trois milieux MSAé et TSB.

d) *Composition actuelle*

La composition en vitamines pour les milieux synthétiques est décrite **tableau 19**:

Vitamine	Concentration finale	Solvant
Thiamine	300 µg/L	H ₂ O
Pyridoxine	900 µg/L	H ₂ O
Pyridoxamine	900 µg/L	H ₂ O
Pyridoxal	900 µg/L	H ₂ O
Pantothénate	2,8 mg/L	H ₂ O
Nicotinamide	5,6 mg/L	H ₂ O
Cobalamine	2,6 mg/L	H ₂ O
Acide ascorbique	1,7 mg/L	H ₂ O
Riboflavine	1 mg/L	NaOH 0,1 M
PABA	1,7 mg/L	Ethanol 70%
Biotine	50 µg/L	NaOH 0,1 M
Acide Folique	110 µg/L	NaOH 1 M
Phylloquinone	1,7 mg/L	Acétone

Tableau 19 : Composition en vitamines du milieu synthétique. Les solutions mère sont réalisées à des concentrations de 100 mg/10ml selon le solvant indiqué.

e) *Conclusion/Discussion*

Le choix des vitamines n'est pas chose facile car certaines sont vitales pour les micro-organismes alors que d'autres ne sont pas requises pour leur croissance mais peuvent avoir un effet bénéfique sur cette dernière. Cependant, trop de vitamines présentes dans le milieu perturbent la croissance des micro-organismes à développement lent. Il semble difficile d'enlever une vitamine de la composition actuelle, étant donné que les milieux synthétiques doivent permettre d'obtenir la croissance du plus grand nombre de micro-organismes. Cependant une étude plus approfondie de la concentration de chaque vitamine est encore nécessaire afin d'optimiser les performances des milieux. Il est également envisageable qu'une vitamine améliorant la croissance d'une espèce bactérienne soit absente. Il est possible de vérifier l'impact d'une vitamine sur une bactérie de manière rapide. Une méthode similaire à celle de l'antibiogramme peut être utilisée : si un milieu synthétique est réalisé de manière solide, des disques imbibés d'une solution, d'une vitamine à tester, à différentes concentrations, pourraient être déposés sur le milieu synthétique solide. Un nombre d'UFC défini permettant d'obtenir un tapis bactérien serait déposé sur le milieu gélosé. Si la vitamine apporte un bénéfice à la croissance bactérienne, le tapis bactérien sera plus important au niveau du disque contenant la meilleure concentration (gradient de concentration dans la gélose).

VII. Préparation des milieux synthétiques

a) Formation de précipités lors de la réalisation des milieux

Lors de la réalisation des premiers milieux de culture synthétiques, les solutions mères de chaque famille n'avaient pour solvant que de l'eau. Toutes les solutions mères étaient mélangées ensemble et autoclavées à 121 °C durant 15 minutes. Malgré le passage à l'autoclave, les milieux contenaient de nombreux précipités blanchâtres rendant les milieux impossibles à utiliser. Comme vu dans les parties précédentes, les composés des différentes familles ont fait l'objet de tests afin d'obtenir des solutions mères limpides rendant le milieu totalement limpide, même après autoclavage.

1) Précipitation des sels

Différents sels sont ajoutés aux milieux de culture synthétiques pour subvenir aux besoins nutritionnels des bactéries comme le phosphate de potassium monobasique de formule KH_2PO_4 , principale source de potassium, le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) en tant que source d'azote, le sulfate de magnésium (MgSO_4) fournissant le magnésium ainsi que le chlorure de calcium CaCl_2 . Les concentrations fixées au départ étaient de 1 g/L pour le KH_2PO_4 et le NH_4Cl , 0,1 g/L pour le MgSO_4 et 0,02 g/L pour le CaCl_2 . Dans le but d'optimiser les performances des milieux, des gammes de concentrations ont été réalisées. Pour simplifier la préparation des milieux, les différentes concentrations de sels étaient ajoutées après filtration dans des bouteilles 100 ml, contenant les milieux synthétiques déjà autoclavés. Les résultats obtenus n'avaient pas montré d'amélioration par rapport aux concentrations originales hormis pour *B. subtilis* qui se développait plus rapidement avec une concentration de 1 g/L de MgSO_4 (données non montrées). Afin de tester cette concentration sur un plus grand nombre de souches, cette concentration a été incorporée avant autoclavage à un litre de milieu. Une fois le milieu autoclavé, des précipités s'étaient formés au fond de la bouteille. Différentes formes d'hydratations du MgSO_4 ainsi que du chlorure de magnésium, également sous différentes formes d'hydratations ont été testées. Les précipités étaient toujours présents.

Cependant, le $MgSO_4$ autoclavé seul ou avec les autres sels ne produisait pas ou très peu de précipités. Ces précipités sont donc le résultat de l'interaction du magnésium avec un ou plusieurs composés des autres familles lors de la phase d'autoclavage. La concentration du magnésium est de ce fait restée à 0,1 g/L.

b) *Préparateur semi-industriel*

Le préparateur semi-industriel permet de produire jusqu'à onze litres de milieu de culture. Ce type de préparateur contient une cuve de 15 litres, mélange et autoclave de manière automatique le milieu de culture. Une pompe péristaltique permet de transvaser le milieu de culture de manière stérile. Le préparateur a été utilisé afin de produire des volumes de cinq litres de milieu synthétique. Dès les premiers essais, et malgré toutes les solutions mères dissoutes, des précipités sont apparus. Afin de déterminer la nature de ces précipités, différentes préparations ont été réalisées dans le préparateur avec ou sans addition de certains sels. Les résultats ont montré que la présence de magnésium et ou de calcium augmentait la quantité de précipités. Cependant, même en absence de tous les sels, de petites quantités de précipités se formaient dans les cinq litres de milieu. Il a donc été impossible de définir avec précision la nature des précipités mais il semblerait qu'une grande quantité de composés, même dissous préalablement, formeraient des interactions entre eux lors de l'augmentation de la température pendant la période d'autoclavage. Les sels pourraient favoriser ces interactions.

c) *La filtration*

Etant donné que les problèmes d'interactions entre les molécules apparaissent après autoclavage, nous avons envisagé et adopté la filtration comme moyen d'obtenir un milieu synthétique stérile et limpide. Les milieux sont filtrés par des membranes en ester de cellulose comportant des pores de 0,22 μm de diamètre. Les milieux peuvent toujours être préparés grâce au préparateur. Dans ce cas, les solutions mères sont incorporées ensemble dans le préparateur et complétées du volume d'eau nécessaire après ajustement du pH. Le milieu est

alors homogénéisé vingt minutes puis filtré grâce à un système de filtration stérilisante installé en aval de la pompe péristaltique.

VIII. Performances des milieux synthétiques sur le panel de micro-organismes

Suite à l'élaboration de la composition des différentes familles, le panel de micro-organismes a été testé dans les milieux synthétiques aérobies et anaérobies. Pour rappel, Les milieux TSB et MSaé ont été incubés à 22,5°C et les milieux FTM et MSana à 32, 5°C.

a) Milieu synthétique aérobie

Le **tableau 20** montre les résultats du milieu MSaé à ce niveau d'avancement. Les souches *A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *E. coli* et *B. subtilis* se développaient de la même manière dans le milieu MSaé que dans le milieu TSB. *S. aureus* quant à lui, se développait plus rapidement dans le milieu synthétique. Cependant, *S. epidermidis* avait un retard de croissance dans le milieu synthétique de plus de 20 heures et *M. extorquens* et *R. pickettii* ne se développaient pas.

Souches \ Milieux	TSB	MSaé
<i>A. brasiliensis</i>	72 h	72 h
<i>B. subtilis</i>	43 h	43 h
<i>C. albicans</i>	45 h	45 h
<i>E. coli</i>	29 h	29 h
<i>M. extorquens</i>	135 h	-
<i>P. aeruginosa</i>	45 h	45 h
<i>R. pickettii</i>	165 h	-
<i>S. aureus</i>	45 h	31 h
<i>S. epidermidis</i>	68 h	92 h

Tableau 20 : Performances du milieu MSaé sur les bactéries aérobies. En bleu sont représentées les croissances équivalentes entre le milieu MSaé et le milieu TSB. En vert, meilleure croissance dans le MSaé ; en rouge, croissance plus lente dans le MSaé. – absence de croissance.

b) Milieu synthétique anaérobie

Le milieu MSana offrait les mêmes performances que le milieu FTM pour *C. sporogenes* alors que la croissance de *B. vulgatus* et *P. acnes* était nulle même après plusieurs semaines (voir **tableau 21**).

Souches \ Milieux	FTM	MSana
<i>C. sporogenes</i>	24 h	24 h
<i>B. vulgatus</i>	230 h	-
<i>P. acnes</i>	233 h	-

Tableau 21 : Performances du milieu MSana sur les bactéries anaérobies. En bleu sont représentées les croissances équivalentes entre le milieu MSana et le milieu TSB. – absence de croissance.

IX. Milieu synthétique pour *Methylobacterium extorquens*

Les résultats du **tableau 20** montrent que *M. extorquens* ne se développait pas dans le milieu synthétique. Les espèces de *Methylobacterium* sont identifiées comme souches à développement lent. En effet, *M. extorquens* met jusqu'à 6 jours pour être visible dans le milieu TSB. *Methylobacterium sp.* se développe plus rapidement dans des milieux plus pauvres en nutriments comme le milieu R2A (Reasoner and Geldreich, 1985). Dans le but de permettre la croissance de *M. extorquens* dans le milieu MSAé, cette bactérie a fait l'objet d'essais notamment sur sa capacité à assimiler différentes sources de carbone.

a) Les différents milieux synthétiques testés

M. extorquens ne se développant pas dans le milieu synthétique, il fallait sélectionner un milieu synthétique afin d'évaluer les composants nécessaires à la croissance de cette bactérie. Les milieux synthétiques décrits dans la littérature pour *M. extorquens* ont des compositions et des concentrations différentes selon les applications souhaitées et la plupart d'entre eux contiennent du méthanol comme source de carbone. Plusieurs milieux ont été évalués afin d'obtenir la croissance la plus rapide de *M. extorquens*. Ces milieux sont décrits en **Annexes 6, 7 et 8** (Bourque *et al.*, 1995; Okubo *et al.*, 2007; Peyraud *et al.*, 2009). Afin d'évaluer les milieux, le pyruvate a été choisi comme source de carbone. Les résultats obtenus ont été comparés à du milieu R2A sans agar (R2B) où *M. extorquens* se développe en 4 jours. Les résultats ont montré que seul le milieu décrit dans la publication de Peyraud et son équipe (**Annexe 8**), complémenté de pyruvate, a permis une meilleure croissance de *M. extorquens* en 4 jours. La bactérie s'est développée en plus de 6 jours dans les autres milieux. Une fois ce milieu retenu, il a été quelque peu modifié en enlevant l'EDTA (molécule potentiellement toxique pour les micro-organismes) dans l'optique d'étudier la croissance d'autres bactéries dans ce milieu. Ce milieu dénommé MSCoA (composition décrite à la **figure 44**) a été utilisé pour évaluer l'impact de différentes sources de carbone sur la croissance de *M. extorquens*.

Composition du milieu MSCoA :

Concentrations pour 1L:

NH ₄ CL.....	1,62 g/L
MgSO ₄	0,2 g/L
K ₂ HPO ₄	2,21 g/L
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....	1,25 g/L
C ₃ H ₃ NaO ₃	2 g/L (pyruvate, non ajouté lors des tests sur les sources de carbone)

Elements traces:

ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	4,5 mg/L
CoCl ₂ .6h ₂ O.....	0,3 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	1 mg/L
H ₃ BO ₃	1 mg/L
CaCl ₂	2,5 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,4 mg/L
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	3 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,3 mg/L

Figure 44 : Composition du milieu MSCoA pour *Methylobacterium extorquens*.

Par la suite, un nouveau milieu de culture pour cette bactérie a été décrit dans la littérature comme étant l'un des plus performant (Delaney *et al.*, 2013) (**Annexe 9**). Ce milieu a été comparé au MSCoA. *M. extorquens* a été détecté dans les deux milieux au terme de 96 heures. Le milieu MSCoA étant plus rapide à préparer, ce dernier a été retenu pour la suite des tests. Notons que le milieu MSaé a également été préparé contenant les mêmes concentrations que celles des molécules utilisées dans le milieu MSCoA, mais cela n'a pas permis la croissance de *M. extorquens* (données non montrées).

b) *Evaluation de différentes techniques d'analyse de croissance chez M. extorquens*

M. extorquens est une bactérie à croissance lente et se développant, selon son environnement, sous forme d'agrégats (fins voiles de couleur rose très difficiles à désagréger), ce qui peut poser problème pour l'estimation de la densité optique (DO). Pour pallier à ce problème, des techniques plus précises ont été évaluées.

1) Analyse de la DO par lecteur de plaque

L'avantage de l'utilisation d'un lecteur de plaque par rapport à la prise manuelle de la densité optique, hormis l'automatisation du procédé, est que la microplaque peut être agitée de manière vive toutes les heures, limitant ainsi la formation des agrégats. Le principal désavantage est la faible quantité d'oxygène présente à l'intérieur de la microplaque. Les premières expériences ont été réalisées avec une plaque sans couvercle. Les tests de croissance en plaque effectués avec *M. extorquens* sur 99 heures n'ont pas permis de mesurer un début de croissance. Pour contourner cette difficulté, la température d'incubation a été augmentée de 22,5°C à 32°C. Les conditions ne sont alors plus représentatives des conditions initialement étudiées mais peuvent permettre de valider des résultats obtenus par détection visuelle si nécessaire.

2) Comptage des bactéries par cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet de comptabiliser à l'aide d'un laser le nombre de particules présentes dans un fluide. Le protocole utilisé combine deux fluorochromes, l'un marquant les cellules vivantes (syto9, fluorochrome vert) et l'autre les cellules mortes (Pi, fluorochrome rouge). Les éléments peuvent être représentés en fonction de différents paramètres comme de leur taille, leur granulosité ou par l'affiliation de leur fluorochrome. Selon l'interprétation souhaitée, ces différents paramètres peuvent être comparés entre eux. Les bactéries étant plus grandes et plus granuleuses que les particules présentes dans le milieu, l'utilisateur peut selon ses paramétrages, différencier les particules des bactéries. La

figure 45 représente la différenciation entre les particules du milieu TSB 1/2 et les cellules de *M. extorquens* après 40 heures d'incubation. Une fois ces dernières différenciées, le logiciel du cytomètre convertit directement les résultats en nombre de cellules par ml.

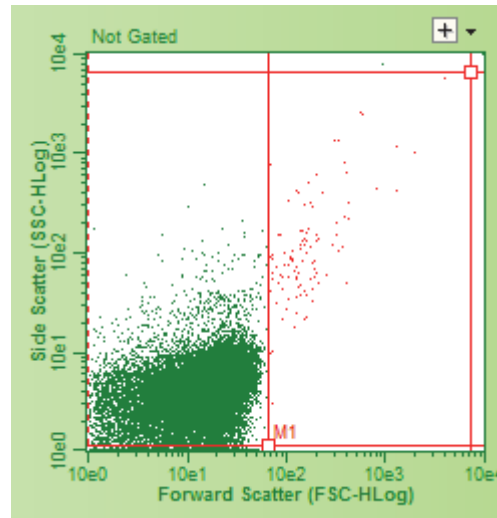


Figure 45 : Graphique représentant les éléments en fonction de leur taille et de leur granulosité dans le milieu TSB 1/2. L'axe des abscisses représente la taille des éléments (paramètre FSC) et l'axe des ordonnées représente la granularité (paramètre SSC). Les éléments verts représentent les particules du milieu de culture et les éléments rouges les bactéries (*M. extorquens*) après 40 heures d'incubation.

La **figure 46** montre la différence de croissance de *M. extorquens* dans le milieu TSB 1/2 et le R2B. D'après cette analyse, la bactérie a un temps de génération très légèrement plus court dans le milieu TSB 1/2.

Différentes cinétiques de croissance ont été réalisées en utilisant ces deux milieux, mais il s'est avéré que les résultats n'étaient pas reproductibles, ce qui est sans doute lié au fait qu'il est difficile de différencier les particules des bactéries, surtout si la concentration en bactéries est élevée. Pour cette raison cette méthode n'a pas été retenue pour la suite des expériences. Il est tout de même intéressant de noter que les milieux synthétiques contiennent beaucoup moins de particules que les milieux complexes, rendant la différenciation particules/bactéries plus facile. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'un milieu de culture synthétique est plus appropriée pour l'analyse de la croissance des micro-organismes par cytométrie de flux (après optimisation).

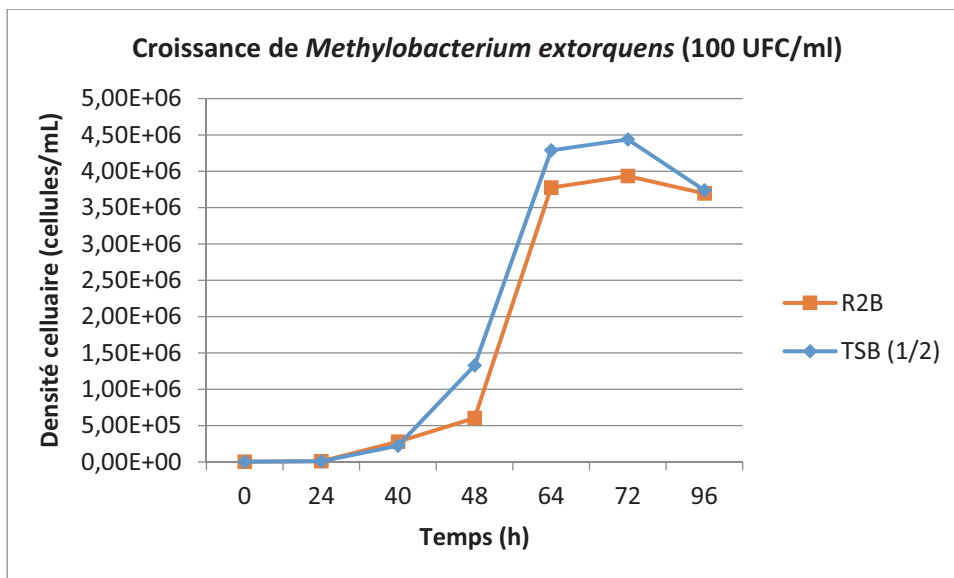


Figure 46 : Croissance de *M. extorquens* dans du milieu R2B et TSB dilué de moitié. Les résultats sont obtenus par cytométrie en flux et sont exprimés en nombre de cellules par ml.

3) PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel a également été évaluée. Cette technique permet de mesurer la quantité d'ADN à chaque cycle d'amplification de la PCR à l'aide d'un marqueur fluorescent, le SYBR Green I dans notre cas. Ce marqueur devient fluorescent lorsqu'il se fixe à un double brin d'ADN. De ce fait, la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générée. Une cinétique est alors réalisée, permettant d'extrapoler la quantité d'acides nucléiques présente dans l'échantillon d'origine.

Une fois les prélèvements effectués dans les milieux à analyser, les cellules bactériennes sont lysées et soumises au sonicateur. Les acides nucléiques sont purifiés puis mélangés aux amorces correspondant à un fragment l'ARNr 16S de *M. extorquens* ainsi que le marqueur fluorescent.

Des échantillons ont été prélevés à différents temps dans les cultures en milieu R2B ainsi que dans celles en milieu MScOA complété en méthylamine ou en pyruvate comme source de carbone. Les résultats représentés **figure 47** indiquent la quantité d'ADN de la bactérie

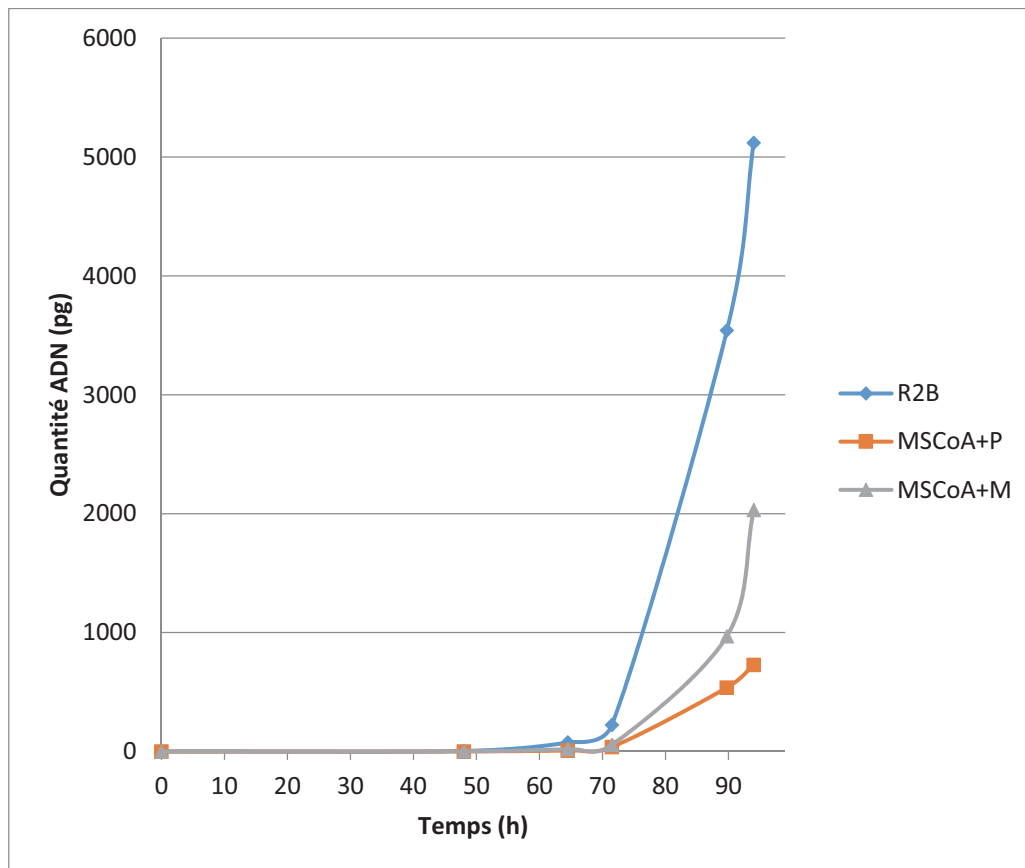


Figure 47 : Résultats de la Q-PCR indiquant la quantité d'ADN de *M. extorquens* présente dans des échantillons prélevés à différents temps dans les cultures sur milieux R2B, MScCoA + pyruvate et MScCoA + méthylamine. Les différentes prises d'échantillons sont représentées par un losange bleu pour le R2B, un rectangle orange pour le MScCoA+pyruvate (MScCoA+P) et un triangle gris pour le MScCoA+méthylamine (MScCoA+M).

présente dans les différents échantillons. On observe que la quantité d'ADN augmente beaucoup plus rapidement dans le milieu R2B suivi du milieu MScCoA + méthylamine puis du milieu MScCoA + pyruvate. Ces résultats ne correspondent pas aux résultats visuels où le milieu MScCoA supplémenté de pyruvate permet une détection plus rapide. Ces résultats peuvent être interprétés de 2 manières : 1) en présence de méthylamine, la bactérie sort plus vite de sa phase de latence mais son temps de génération est bien plus long qu'en présence de pyruvate, ou 2) la technique n'est pas totalement fiable, ce qui peut être lié à des problèmes d'hybridation du marqueur fluorescent (communication personnelle, laboratoire R&D de Merck Millipore). Suite à ces incertitudes, il a été décidé de ne pas retenir cette méthode pour la suite des expériences.

En conclusion, la détection visuelle de l'apparition d'un trouble (ou de la formation d'un biofilm) dans le milieu de culture ou encore la mesure de la DO restent les méthodes les

plus simples et rapides permettant d'obtenir des résultats reproductibles. Même si ces techniques n'étaient pas adaptées pour élaborer la formulation de base des milieux MSana et MSaé, elles pourraient représenter un intérêt, suite à une mise au point plus approfondie des paramètres, pour mettre en évidence des différences de croissance plus subtiles qui ne seraient pas visibles à l'œil nu.

c) Comparaison des sources de carbone utilisées par *M. extorquens*

1) Assimilation d'une seule source de carbone

Selon le nombre de carbone présents dans un substrat, *M. extorquens* utilise des voies différentes d'assimilation. Un des objectifs de ce travail était d'évaluer la croissance de cette bactérie sur différentes sources de carbone, sans les combiner, afin de définir celle qui permettrait d'obtenir la croissance la plus rapide dans le milieu synthétique. D'après la littérature, *M. extorquens* génère le plus de biomasse en présence de méthanol. Le pyruvate vient en second devant le succinate (Van Dien *et al.*, 2003). Notons cependant que le méthanol

Molécules	Nombre de carbone(s)	Concentrations testées
Méthylamine	1	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Formaldéhyde	1	300µl/L ; 600µl/L ; 900µl/L ; 1,2ml/L
Acide formique	1	300µl/L ; 600µl/L ; 900µl/L ; 1,2ml/L
Sodium formate	1	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Acide acétique	2	300µl/L ; 600µl/L ; 900µl/L ; 1,2ml/L
Acétate de sodium	2	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Oxalate de potassium	2	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Pyruvate de sodium	3	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Acide malique	4	0,1g/L ; 0,2g/L ; 0,5g/L ; 1g/L
Acide malique disodium	4	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Succinate de sodium dibasic hexahydrate	4	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Triméthyl-glycine	5	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L
Glucose	6	0,1g/L ; 0,5g/L ; 1g/L ; 2g/L

Tableau 22 : Sources de carbone testées dans le MSCoA pour l'étude de la croissance de *M. extorquens*.

(1C) n'a pas été évalué car cet alcool peut facilement s'évaporer et pourrait être toxique pour d'autres souches que *M. extorquens*. Les sources de carbone évaluées n'ont pas toutes été décrites dans la littérature et certaines ont été testées sous formes d'acides et de sels. Le **tableau 22** récapitule les sources de carbone testées dans notre travail.

Beaucoup de ces sources de carbone n'ont pas permis la croissance de *M. extorquens* dont toutes les molécules sous formes d'acides. Le **tableau 23** expose les résultats obtenus sur les milieux où la croissance a été observée.

Les résultats montrent que seuls les milieux contenant du pyruvate de sodium ou de l'oxalate de potassium permettent la détection visuelle de *M. extorquens* en 90 heures. Dans les milieux

MSCoA + source carbone	Temps (h)									
	72 h	91 h	96 h	113 h	145 h	168 h	239 h	300 h	> 372 h	
Pyruvate de sodium (3C) 0,5 g/L	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Pyruvate de sodium (3C) 1g/L - 2g/L	-	+/-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Oxalate de potassium (2C) 0,5g/L	-	+/-	+	++	++	++	+++	+++	+++	
Oxalate de potassium (2C) 1 g/L - 2g/L	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
Triméthyl-glycine (5C) 0,1 g/L - 1 g/L	-	-	+/-	++	+++	+++	+++	+++	+++	
Succinate de sodium (4C) 0,1 g/L	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
Succinate de sodium (4C) 1 g/L - 2 g/L	-	-	+/-	++	+++	+++	+++	+++	+++	
Méthylamine (1C) 0,1 - 1 g/L	-	-	-	-	+/-	+	++	++	++	
Acétate de sodium (2C) 0,5 g/L	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	
Acétate de sodium (2C) 1 g/L	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	

Tableau 23 : Evaluation de la croissance par détection visuelle de *M. extorquens* dans le milieu MSCoA contenant différentes sources de carbone. Le début de détection est représenté par une case verte.+/- léger début de croissance, un très faible trouble est visible dans la bouteille; + léger trouble ; ++ trouble important ; +++ bouteille totalement trouble.

contenant la triméthyl-glycine (bétaine) et le succinate, la culture devient visible au bout d'une centaine d'heures. Les milieux contenant de la méthylamine comme source de carbone permettent la détection visuelle de *M. extorquens* après 145 heures. Pour l'acétate, la détection est visible entre 250 et 300 heures. Les résultats entre l'oxalate de potassium à 0,5 g/L et le pyruvate de sodium à 1g/L ou 2g/L sont assez proches mais les milieux contenant le pyruvate deviennent plus rapidement troubles, indiquant une meilleure croissance de *M.extorquens*.

Il est surprenant que la bactérie ne se soit pas développée en présence de formaldéhyde. Lors de son incorporation dans la cellule et avant d'être métabolisée au cycle de la sérine, le formaldéhyde est couplé à des dérivés de la vitamine B9, l'acide tétrahydrofolique ou la tétrahydrométhanoptérine (Chistoserdova *et al.*, 2003). Ces molécules ainsi que la vitamine B9 ont été ajoutées séparément ou non avec le formaldéhyde dans le milieu MScOA. L'ajout de ces molécules n'a pas permis la croissance de *M. extorquens* (données non montrées).

Le glucose est connu pour ne pas être assimilé par *M.extorquens*. Cette molécule a cependant été testée, car elle est la source de carbone du TSB. Le TSB dilué de moitié permet une croissance légèrement inférieure au R2B. Cette expérience confirme également que la bactérie utilise soit certains acides aminés présents dans le TSB, soit une autre source de carbone non identifiée provenant des peptones de caséine ou de soja.

2) Combinaison de plusieurs sources de carbone

Des études récentes ont montré que *M.extorquens* pouvait assimiler deux sources de carbone à la fois (Peyraud *et al.*, 2012). Afin de voir si l'assimilation simultanée de deux sources de carbone pouvaient avoir un effet bénéfique sur cette bactérie, les sources de carbone identifiées dans le **tableau 23** ont été testées aux mêmes concentrations que celles utilisées dans le milieu MScOA avec du pyruvate de sodium à 1g/L. Les résultats n'ont pas montré de différences par rapport au témoin MScOA ne contenant que le pyruvate hormis pour la méthylamine. La détection visuelle n'a pas montré de différence mais les données obtenues avec deux lecteurs de plaques différents ont indiqué une croissance légèrement accélérée lors de la combinaison du pyruvate de sodium à 1g/L et de la méthylamine à 100 mg/L. L'un des deux lecteurs de plaques (Tecan) indique un début de croissance avancé de 4 heures par

rapport au MSCoA contenant simplement le pyruvate. Les données de l'autre lecteur (Gimini) sont représentées à l'état brut **figure 48**. La différence observée est d'une dizaine d'heures dans celui-ci. Ces résultats doivent être pris comme indication mais ne permettent pas de conclure car ce phénomène n'a pas été observé en visuel. De ce fait, seul le pyruvate de sodium a été retenu pour compléter le milieu synthétique aérobie.

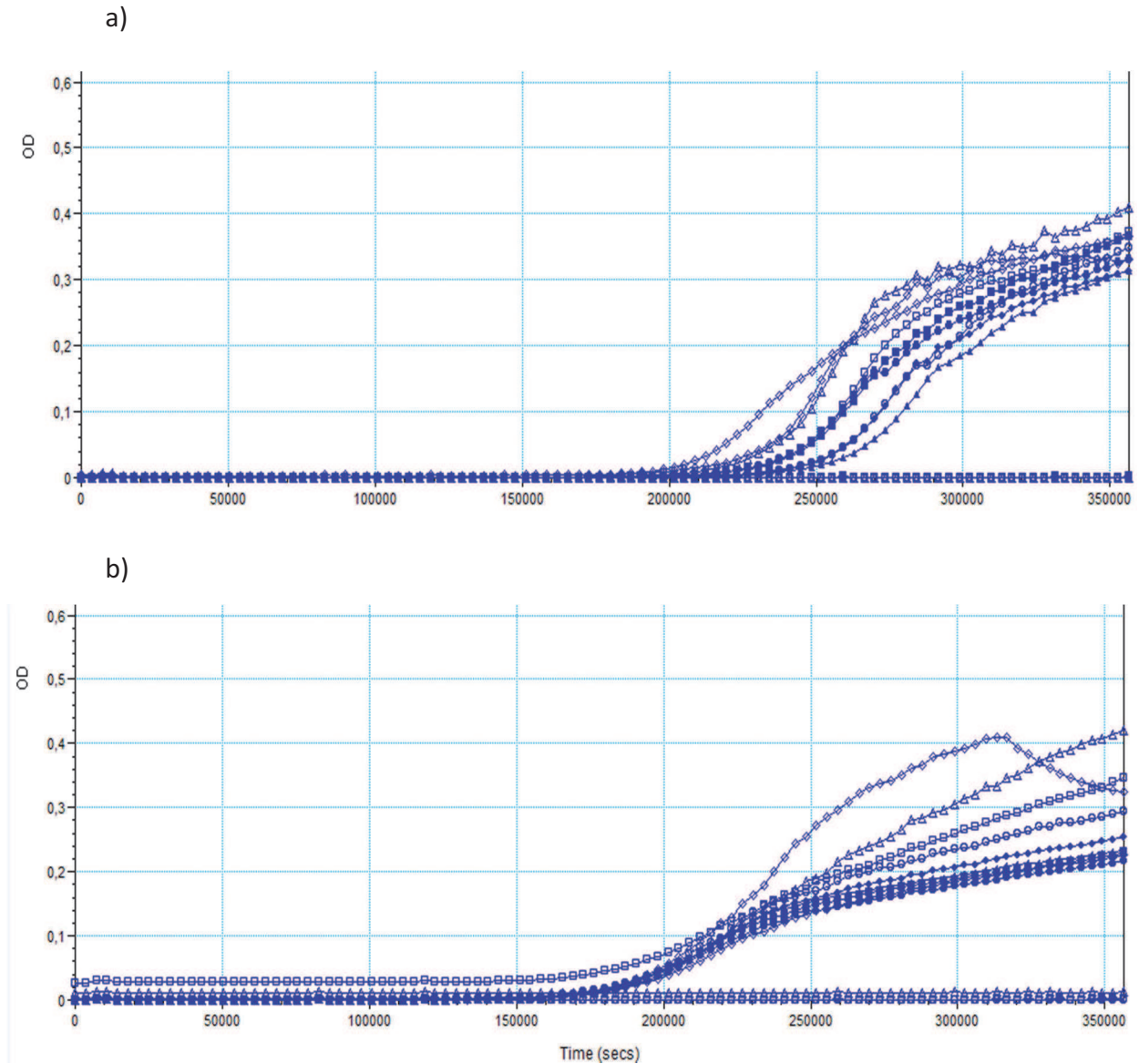


Figure 48 : Courbes de croissance obtenues par lecture de densité optique toutes les heures pour *M. extorquens* dans le milieu MSCoA contenant du pyruvate ou du pyruvate + méthylamine comme source de carbone. DO (coordonnées normales) en fonction du temps (secondes). a) Evaluation de la croissance de *M. extorquens* en MSCoA + pyruvate 1g/L dans 9 puits. b) Evaluation de la croissance de *M. extorquens* en MSCoA + pyruvate 1g/L + méthylamine 100mg/ dans 9 puits. La ligne de base correspond à 3 puits témoins non inoculés.

d) *Conclusion/Discussion*

La mise au point d'un milieu synthétique pour *M.extorquens* a permis de conclure que le pyruvate pouvait être une bonne source de carbone à incorporer dans un milieu synthétique permettant une croissance rapide de ce micro-organisme. De plus, le milieu MScOA permet une croissance équivalente voire plus rapide que le R2B qui est la référence des milieux complexes pour la croissance de cette bactérie.

M.extorquens ne se développant pas dans le milieu MSaé, ce dernier a été complété par les composants spécifiques du milieu MScOA. Cela n'a cependant pas permis la croissance de la bactérie. Ce résultat suggère que le milieu MSaé possède des composants bactériostatiques ou bactéricides pour *M. extorquens* mais n'a pas fourni d'informations pour la complémentation du milieu MSaé.

X. Finalisation des milieux synthétiques

Les **tableaux 20 et 21** montrent que *Ralstonia picketti* et *Methylobacterium extorquens* ne se développent pas dans le milieu MSaé ainsi que *B. vulgatus* et *P. acnes* dans le milieu MSana. Les recherches se sont alors focalisées sur ces quatre bactéries.

a) Etude des souches anaérobies.

Les milieux permettant la croissance des souches anaérobies sont souvent complétés de sang comme par exemple le milieu de culture Columbia (appelé dans ce cas milieu COS). Cependant comme la composition exacte du sang n'est pas clairement définie chimiquement, et il n'existe pas de sang synthétique. L'ajout de sang dans le milieu ne rendrait plus sa composition définie et ne serait plus totalement limpide. Il était donc exclu d'en ajouter dans le milieu Msana. De ce fait, nous avons testé l'ajout d'hémine, susceptible d'améliorer le développement des bactéries anaérobies.

1) Effet bénéfique de l'hémine

Le sang contient de l'hémine, porphyrine composée d'un noyau ferrique permettant de transporter l'oxygène. Des études ont montré que cette molécule pouvait avoir un effet bénéfique pour la croissance des souches anaérobies (Roe *et al.*, 2002). L'hémine a été ajoutée au milieu MSaé, aux concentrations indiquées par la publication (5mg/L), et les trois souches anaérobies ont été testées. Le **tableau 24** montre que la bactérie *B. vulgatus* s'est développée

Souches	Milieux	
	FTM	MSana
<i>C. sporogenes</i>	24 h	24 h
<i>B. vulgatus</i>	230 h	91 h
<i>P. acnes</i>	233 h	-

Tableau 24 : Performances du milieu MSana avec et sans ajout d'hémine sur la liste de souches anaérobies. En bleu sont représentées les croissances équivalentes au milieu TSB. En vert, croissance plus rapide que le milieu TSB. – absence de croissance.

en 91 heures dans le milieu MSana. L'hémine permet la croissance de cette souche et de manière plus rapide que dans le FTM. Cette molécule ne semble pas avoir d'impact sur la croissance de *C. sporogenes*. Par contre, son ajout au milieu ne permet pas la croissance de *P. acnes*. Nous avons donc considéré ce dernier cas à part.

2) Cas de *P. acnes*

P. acnes est le seul micro-organisme anaérobie du panel qui ne se développe pas dans le milieu MSana. Il s'agit d'une bactérie exigeante qui nécessite l'apport d'acides aminés et de vitamines pour sa croissance (Gribbon *et al.*, 1993). La composition du milieu MSana a été comparée à deux milieux synthétiques permettant la croissance de *P. acnes* (Ferguson and Cummins, 1978; Gribbon *et al.*, 1993), et nous avons pu voir que le milieu MSana contient tous les ingrédients retrouvés dans les deux milieux à l'exception des trois suivants : l'acide oléique, l'acétate et le pyruvate. L'acide oléique est un lipide constituant de la peau, environnement fréquent de *P. acnes*. Une forme soluble de ce lipide a été testée à une concentration de 20 mg/L dans le milieu MSana. Les sources de carbone utilisées dans ces milieux sont l'acétate et le pyruvate. Une concentration de 3g/L d'acétate et de 2g/L de pyruvate a été testée. Ces molécules ont été ajoutées ensemble ou séparément dans le milieu MSana. Aucune combinaison n'a permis la croissance de la bactérie. Du sang de mouton à une concentration équivalente à celle du milieu COS (5% v/v) a également été ajouté au milieu MSana. *P. acnes* ne s'est pas non plus développé dans ce milieu. Ce dernier milieu étant très riche, ces résultats indiquent que le non développement de *P. acnes* n'est pas lié à une carence. De plus, nous avons montré que si *P. acnes* est inoculée dans le milieu MSana durant plusieurs semaines, que le milieu est filtré sur une membrane à pores de 0,22 µm de diamètre et que cette dernière est déposée sur gélose COS, puis mise en condition d'anaérobiose, la bactérie se développe. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'un ou plusieurs éléments du milieu MSana exercent un pouvoir bactériostatique, inhibant la croissance de la bactérie mais ne la tuant pas.

b) Etude des souches aérobies

Les bactéries *R. picketti* et *M. extorquens* sont des contaminants fréquemment retrouvés dans l'eau et sont cultivés en laboratoire sur des milieux « pauvres » en nutriments. Etant donné que ces deux bactéries ne se développent pas dans le milieu MSaé, l'hypothèse d'une pression osmotique trop forte dans le milieu a été émise.

1) Dilution des milieux

Afin de vérifier l'hypothèse ci-dessus, des dilutions du milieu MSaé ont été réalisées allant de 1/2 au 1/8. *R. picketti* a pu se développer dans le milieu MSaé 1/2 et à toutes les autres dilutions supérieures. *M. extorquens*, quant à elle, s'est développée dans le milieu dilué au 1/5 et plus. Cette bactérie est capable de se développer dans du milieu TSB, comprenant la même concentration de la plupart des sels présents dans le milieu MSaé non dilué. Les oligo-éléments, les vitamines et les bases azotées sont présentes en faibles quantités le milieu MSaé non dilué par rapport aux acides aminés et aux sels. Ces éléments ne devraient pas avoir beaucoup d'impact sur la pression osmotique. Afin de vérifier cette hypothèse, du milieu MSaé contenant une concentration en acides aminés diluée au 1/5 et une concentration en sels et sources de carbone diluée au 1/2 a été réalisé et testé sur tout le panel de micro-organismes aérobies. Etonnamment, tous se sont développés dans des temps similaires à ceux qui avaient été observés pour le milieu MSaé non dilué hormis *S. epidermidis* qui a montré un retard de plus d'une centaine d'heures (données non montrées), et *M. extorquens* qui ne s'est pas développée. Des gammes de sels et de bases azotées ont été effectuées en gardant les acides aminés dilués au 1/5 comme le montre le **tableau 25**. Les résultats indiquent que *M. extorquens* ne se développe qu'à partir d'une concentration en sels diluée au 1/3. Cependant, *S. epidermidis* ne se développe pas à de si faibles concentrations.

Milieux \ Souche	<i>M. extorquens</i>	<i>S. epidermidis</i>
aa 1/5, sels 1/2, ba 1	-	185 h
aa 1/5, sels 1/2, ba 1/2	-	-
aa 1/5, sels 1/2, ba 1/5	-	-
aa 1/5, sels 1/3, ba 1	232 h	-
aa 1/5, sels 1/3, ba 1/2	232 h	-
aa 1/5, sels 1/3, ba 1/5	167 h	-
aa 1/5, sels 1/4, ba 1	167 h	-
aa 1/5, sels 1/4, ba 1/2	95 h	-
aa 1/5, sels 1/4, ba 1/5	95 h	-
aa 1/5, sels 1/5, ba 1	91 h	-
aa 1/5, sels 1/5, ba 1/2	91 h	-
aa 1/5, sels 1/5, ba 1/5	-	-

Tableau 25 : Croissance de *M. extorquens* dans le milieu MSAé comportant différentes dilutions de la famille d'acides aminés (aa), de sels et de bases azotées (ba). Les durées indiquées correspondent au nombre d'heures nécessaires pour détecter la croissance des bactéries.

c) *M. extorquens* vs *S. epidermidis*

La dilution du milieu MSAé permettant à la fois la croissance de *M. extorquens* et *S. epidermidis* n'a pas été trouvée. Soit la dilution en sels est trop faible et *M. extorquens* ne se développe pas, soit la dilution est trop forte et c'est dans ce cas *S. epidermidis* qui ne peut se développer. Afin de palier à ce problème, l'étude d'ajout de molécules favorisant la croissance de l'un ou l'autre micro-organisme a été réalisée.

1) Influence de la bétaine sur la croissance de *M. extorquens*

Les bétaines sont des molécules osmo-protectrices permettant aux micro-organismes de résister à une forte pression osmotique en s'accumulant à l'intérieur du cytoplasme. Afin d'observer l'effet de ces molécules sur la croissance de *M. extorquens*, de la triméthyl-glycine (molécule historiquement appelée bétaine) ainsi que de l'ectoïne ont été ajoutées à du milieu TSB, milieu riche en nutriments. Seule la présence de l'ectoïne a permis d'améliorer la croissance de la bactérie de quelques heures. A l'inverse, l'ajout d'ectoïne n'a permis de

constater de différence de croissance de *M. extorquens* dans le MSAé aa 1/5 à différentes concentrations de sels, alors qu'avec de la triméthyl-glycine, la bactérie se développait plus vite passant de 232 heures à 138 heures, à une concentration en sels 1/3.

2) Impact de l'acide oléique sur *S. epidermidis*

Comme *P. acnes*, *S. epidermidis* est fréquemment retrouvée sur l'épiderme humain. Afin de lui fournir une source d'acides gras, de l'acide oléique a été ajouté au milieu MSAé aa 1/5 et sels de plusieurs dilutions. Il en résulte que la bactérie s'est développée dans le MSAé aa 1/5 et sels 1/3 en 65 heures, ce qui est identique à sa croissance en milieu TSB.

L'ajout de triméthyl-glycine à une concentration de 100 mg/L et d'acide oléique à une concentration de 20 mg/L dans le milieu MSAé aa 1/5, sels 1/3 et ba 1 ont permis la croissance de l'ensemble du panel de micro-organismes aérobie. De ce fait, il n'a pas été possible de garder la même concentration des composants de chaque famille pour les milieux MSAé et MSana.

d) Performances actuelles du milieu Msaé

Les **figures 49** et **50** montrent la croissance de *M. extorquens* et *S. epidermidis* par rapport au milieu TSB. On observe que *M. extorquens* se développe plus rapidement dans le milieu synthétique finalisé que dans le milieu TSB. A l'inverse, *S. epidermidis* se développe avec un léger retard dans le milieu MSAé finalisé.

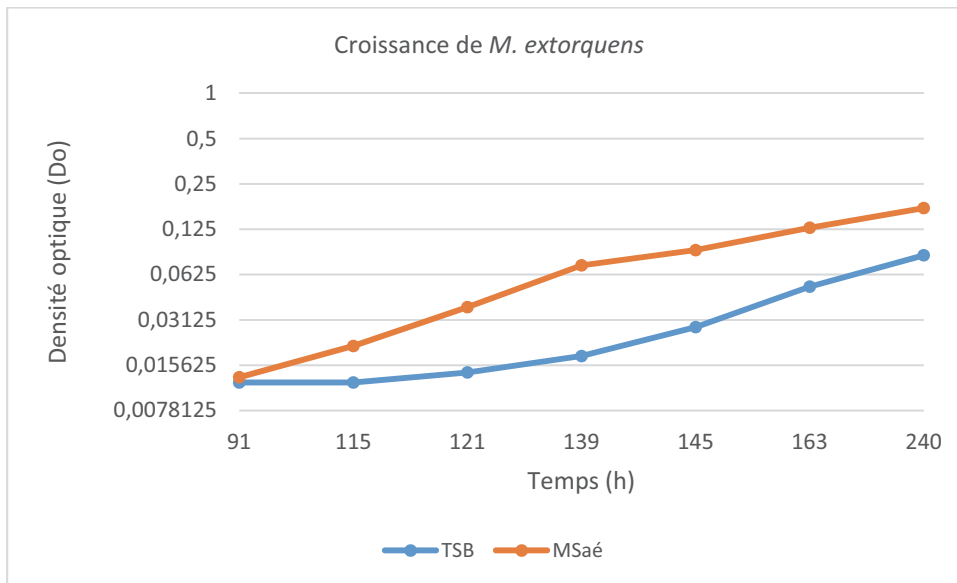


Figure 49 : Courbe de croissance de *M.extorquens* dans le milieu TSB et le milieu MSaé finalisé. N=3, écart-type < 9 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

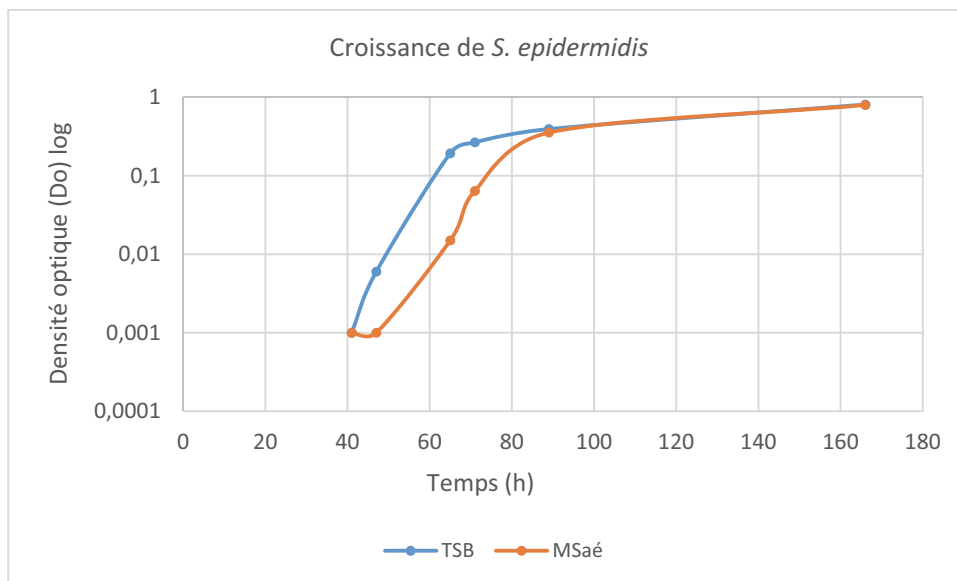


Figure 50 : Courbe de croissance de *S.epidermidis* dans le milieu TSB et le milieu MSaé finalisé. . N=3, écart-type < 8 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

Le **tableau 26** indique les temps de croissance en détection visuelle des micro-organismes du panel aérobie ainsi que quelques autres contaminants souvent retrouvés dans l'eau industrielle comme *Methylobacterium fujisawaense*, *Methylobacterium mesophilicum* et *Paenibacillus lauteus*, afin d'observer les performances du milieu sur un maximum de micro-

organismes. Les temps de détection représentés correspondent à une moyenne de deux expériences. A présent, tous les micro-organismes testés se développent dans la nouvelle formulation du MSaé. Les bactéries exigeantes en nutriments ont tendance à se développer moins rapidement dans le milieu MSaé que dans le milieu TSB. A l'inverse, les bactéries à croissance lente, isolées à partir d'environnements pauvres, se développent plus rapidement dans le milieu MSaé. De ce fait, le milieu synthétique permet à présent la croissance d'une large gamme de micro-organismes aux exigences nutritionnelles variées.

Souches \ Milieux	TSB	MSaé
<i>A. brasiliensis</i>	72 h	46 h
<i>B. subtilis</i>	30 h	43 h
<i>C. albicans</i>	41 h	41 h
<i>E. coli</i>	24 h	26 h
<i>M. extorquens</i>	138 h	137 h
<i>P. aeruginosa</i>	45 h	45 h
<i>R. pickettii</i>	97 h	40 h
<i>S. aureus</i>	36 h	41 h
<i>S. epidermidis</i>	62 h	65 h
<i>P. lautus</i>	41 h	70 h
<i>M. fujisawaense</i>	190 h	163 h
<i>M. mesophilicum</i>	163 h	155 h

Tableau 26 : Croissance des souches du panel dans la nouvelle formulation du milieu MSaé. Sont représentés en bleu les micro-organismes se développant de la même manière dans les 2 milieux, en rouge ceux dont la croissance est plus lente dans le MSaé et en vert ceux dont la croissance est plus rapide dans le MSaé.

e) Formulations définitives des milieux MSaé et MSana

Le **tableau 27** indique la composition du milieu MSaé ainsi que celle du milieu MSana.

Molécules	Concentration par litre	
	Milieu MSaé	Milieu Msana
Acides aminés		
DL-Alanine	100 mg	500 mg
L-Arginine	1 g	5 g
Glycine	100 mg	500 mg
L-Histidine	50 mg	250 mg
L-Hydroxy-proline	40 mg	200 mg
L-Isoleucine	100 mg	500 mg
L-Lysine	100 mg	500 mg
L-Leucine	100 mg	500 mg
DL-Méthionine	70 mg	350 mg
L-Proline	50 mg	250 mg
DL-Phénylalanine	100 mg	500 mg
DL-Sérine	150 mg	750 mg
DL-Thréonine	100 mg	500 mg
DL-Valine	75 mg	375 mg
L-Acide aspartique	100 mg	500 mg
L-Acide glutamique	200 mg	1 g
L-Tryptophane	50 mg	250 mg
L-Tyrosine	50 mg	250 mg
L-Cystine	80 mg	400 mg
Bases azotés		
Adénine	5 mg	5 mg
Guanine	5 mg	5 mg
Uracile	5 mg	5 mg
Thymine	5 mg	5 mg
Xanthine	5 mg	5 mg
Cytosine	1 mg	1 mg

Molécules	Concentration par litre	
	Milieu MSaé	Milieu Msana
Oligo-éléments		
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	10 µg	10 µg
CoCl ₂	10 µg	10 µg
CuCl ₂ .2H ₂ O	10 µg	10 µg
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,5 mg	1,5 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	10 µg	10 µg
NiSO ₄ .6H ₂ O	10 µg	10 µg
ZnCl ₂	1 mg	1 mg
Autres		
NaCl	1,66 g	2,5 g
K ₂ HPO ₄	0,83 g	1 g
Pyruvate	500 mg	
Tryméthyl-glycine	100 mg	
Acide oléique	20 mg	
Dextrose	830 mg	5,5g
KH ₂ PO ₄	330 mg	1 g
NH ₄ Cl	330 mg	330 mg
MgSO ₄	33 mg	100 mg
CaCl ₂	6,6 mg	20 mg
Hémine		5 mg
L-cystéine hydrochloride		500 mg
Résazurine		1 mg
Thioglycolate de sodium		500 mg
Vitamines		
Thiamine	300 µg	300 µg
Pyridoxine	900 µg	900 µg
Pyridoxamine	900 µg	900 µg
Pyridoxal	900 µg	900 µg
Pantothénate	2,8 mg	2,8 mg
Nicotinamide	5,6 mg	5,6 mg
Cobalamine	2,6 mg	2,6 mg
Acide ascorbique	1,7 mg	1,7 mg
Riboflavine	1 mg	1 mg
PABA	1,7 mg	1,7 mg
Biotine	50 µg	50 µg
Acide Folique	110 µg	110 µg
Phylloquinone	1,7 mg	1,7 mg

Tableau 27 : Formulations définitives des milieux synthétiques.

f) *Conclusion/Discussion*

Seul l'ajout de triméthyl-glycine et d'acide oléique ont permis la croissance de *M. extorquens* et de *S. epidermidis* dans le même milieu. Le rôle des bêtaïnes est largement décrit dans la littérature et la plus référencée est la triméthyl-glycine, molécule pouvant également être utilisée comme source de carbone par *M. extorquens* (Madhaiyan *et al.*, 2007). Il est donc justifié de se demander si la triméthyl-glycine joue bien le rôle de bêtaïne et non pas de source de carbone. Cette hypothèse reste cependant peu probable du fait que l'addition de cette molécule avec du pyruvate dans le MSCoA n'avait pas amélioré la croissance de la bactérie et que la quantité utilisée en tant que bêtaïne était assez faible pour constituer une source de carbone appropriée. Il est également intéressant de souligner qu'une autre bêtaïne, l'ectoïne a montré un effet bénéfique sur la croissance de *M. extorquens* dans le milieu TSB, phénomène qui n'a pas été observé dans le milieu MSaé. Cela suggère que l'incorporation de l'ectoïne dans le milieu synthétique peut être différente si d'autres molécules (étant plus purifiées que dans les milieux complexes) empruntent les mêmes voies d'incorporation ou transporteurs membranaires de *M. extorquens* utilisés par cet osmo-protectant. Le marquage radioactif de l'ectoïne permettrait sans doute de répondre à cette question en observant si la molécule marquée est détectée à l'intérieur de la cellule de *M. extorquens*. L'étude d'autres bêtaïnes voire de combinaisons de plusieurs d'entre elles mérite également investigation. En effet, les peptides de petites tailles peuvent également jouer le rôle d'osmo-protectant. Cela pourrait en partie expliquer pourquoi *M. extorquens* peut se développer dans le milieu TSB riche en nutriments.

L'acide oléique a permis la croissance de *S. epidermidis* dans un milieu ayant une faible concentration de nutriments. L'une des niches écologiques de cette bactérie est l'épiderme humain, matrice composée de nombreux lipides. Ce résultat souligne l'importance de l'étude approfondie de l'environnement naturel de la souche en question. Différentes sources de lipides dont le tween, voire même du jaune d'œuf, ont été testées. Cependant, l'acide oléique soluble dans l'eau (acide oléique couplé à une cyclodextrine, molécule améliorant la solubilité) est pour le moment le seul qui a permis l'obtention d'un milieu totalement homogène. De ce fait, l'ajout d'acides gras composés de courtes chaînes (améliorant la dissolution) est une piste

qui mérite d'être approfondie, d'autant plus que d'autres bactéries comme *S .aureus* se développent également sur l'épiderme humain.

B. Evaluation de molécules pouvant impacter la croissance bactérienne

Parallèlement à l'élaboration du milieu de culture, des facteurs de croissances « potentiels » ont été évalués afin de favoriser ou d'accélérer le développement bactérien. Le stade d'élaboration des milieux synthétiques n'étant pas suffisamment avancé pour réaliser les premiers tests, le milieu de culture TSB dilué de moitié a été retenu pour déterminer l'impact des molécules. En effet, ce milieu étant moins concentré en nutriments, il permet le développement plus rapide des bactéries à croissance lente comme *Methylobacterium sp.* mais permet également la croissance de bactéries exigeantes par rapport à un milieu plus pauvre comme le milieu R2A sans agar. Les premiers tests ont été effectués sur quatre bactéries aux exigences nutritionnelles variées. Deux bactéries à Gram positif et deux bactéries à Gram négatif ont été sélectionnées. Chez les Gram négatif, *E. coli* représente le type bactérien à croissance rapide et *M. extorquens* le type bactérien à croissance plus lente. Chez les Gram positif, *B. subtilis* correspond au type bactérien à croissance rapide, et *S. epidermidis* représentant le type bactérien à croissance plus lente, ont été utilisés pour évaluer l'effet des facteurs de croissance. Plusieurs types de molécules ont été sélectionnés et testés.

I. L'acide diaminopimélique

La composition de la paroi bactérienne varie selon l'appartenance au groupe des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram positif, la membrane

cytoplasmique, principalement constituée de phospholipides, est recouverte d'une importante couche de peptidoglycane. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi est composée d'une couche beaucoup plus fine de peptidoglycane, recouverte par la membrane externe, riche en lipopolysaccharides. Le peptidoglycane est majoritairement constitué d'oses ; le N-acétylglucosamine (Nag) et l' N-acétylmuramique (Nam) reliés entre eux par des liaisons β 1-4 glycosidiques formant ainsi les chaînes de glycanes. Ces chaînes de glycanes sont superposées et reliées entre elles par des ponts tétrapeptidiques composés d'une succession de quatre acides aminés. Ces derniers sont la L-alanine, le D-acide glutamique et l'acide diaminopimélique (DAP) ou la Lysine selon les espèces. En effet, le DAP est présent chez les bactéries à Gram négatif ainsi que chez quelques bactéries à Gram positif, les autres possédants de la Lysine à la place.

Shah et ses collaborateurs ont observé que des fragments de peptidoglycane induisaient la sortie de dormance des spores de *B. subtilis* (Shah *et al.*, 2008). Quelques années plus tard, il a été démontré que cette sortie de dormance était induite par le tripeptide Alanine-Glutamine-Acide diaminopimélique (Squeglia *et al.*, 2011). Ce phénomène ne se produisait pas si la lysine remplaçait le DAP dans le tripeptide. Afin d'évaluer si l'ajout de DAP seul avait une action de molécule signal, cet acide aminé a été ajouté au milieu de culture à différentes concentrations.

Les résultats ont permis de constater que le DAP ne semble pas avoir d'influence positive ou négative sur la croissance des bactéries à Gram négatif *E. coli* et *M. extorquens* ni sur *B. subtilis*. En revanche, la croissance de *S. epidermidis* semble être légèrement influencée, de manière positive, en présence de DAP comme le montre la **figure 51**. Cependant, l'effet obtenu du DAP étant faible, la molécule n'a pas été retenue pour être ajoutée aux milieux synthétiques.

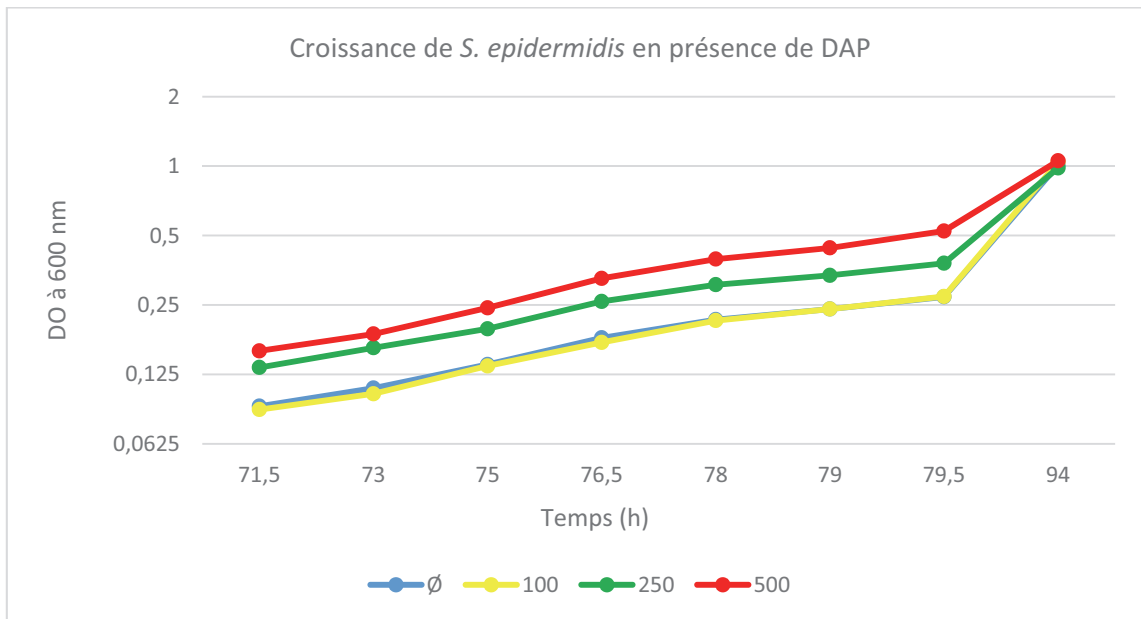


Figure 51 : Croissance de *S. epidermidis* dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations de DAP. En bleu, milieu TSB ½ ; en jaune milieu TSB ½ contenant 100 mg/L de DAP ; en vert milieu TSB ½ contenant 250 mg/L de DAP ; en rouge milieu TSB ½ contenant 500 mg/L de DAP. N=3, écart-type < 8 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

II. L'adénosine monophosphate cyclique (AMPC)

L'adénosine monophosphate cyclique est un messager secondaire ayant de nombreuses fonctions dans la régulation du métabolisme. Celui-ci peut agir au niveau de la transcription des gènes en stimulant la synthèse de certains ARN messagers ou au niveau de la traduction en accélérant la synthèse protéique. L'AMPC joue notamment un rôle important dans l'activation de l'opéron lactose et est synthétisée à partir d'ATP grâce à l'adénylate cyclase (Knott *et al.*, 2014). Les travaux de Bruns et son équipe ont montrés que de faibles concentrations en AMPC accélèrent et augmentent la croissance de bactéries marines, agissant comme un composé de signalisation, permettant aux cellules de sortir d'un état de dormance (Bruns *et al.*, 2002). C'est pourquoi nous avons choisi de tester de faibles concentrations d'AMPC.

Nos résultats ont montré que l'AMPC n'a pas montré d'effet, même aux concentrations indiquées par Bruns *et al.*, sur la croissance de *E. coli*, *S. epidermidis* et *B. subtilis*. Cependant, la croissance de *M. extorquens* semble être stimulée à une concentration de 36 mg/L et ralentie à une concentration de 72 mg/L comme le montre la **figure 52**.

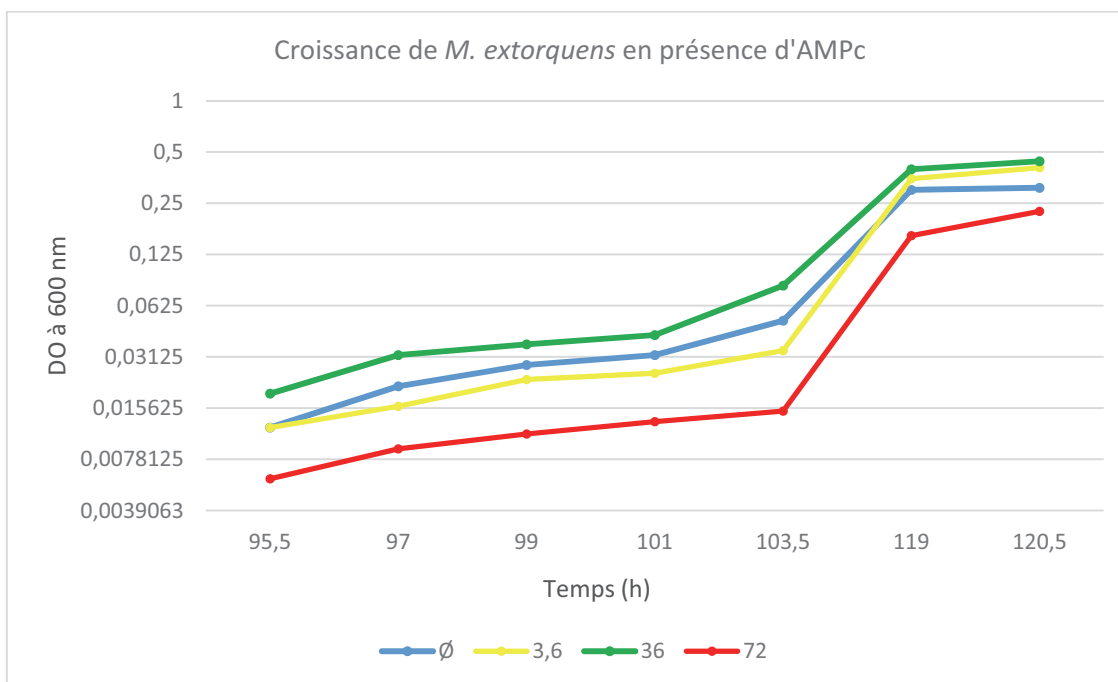


Figure 52 : Croissance de *M. extorquens* dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations d'AMPc. En bleu, milieu TSB ½ ; en jaune milieu TSB ½ contenant 3,6 mg/L d'AMPc ; en vert milieu TSB ½ contenant 36 mg/L d'AMPc ; en rouge milieu TSB ½ contenant 500 mg/L d'AMPc. . N=3, écart-type < 9 %%. Les courbes commencent à 0 à T0.

III. Précurseurs métaboliques

L'oxaloacétate et le pyruvate sont deux précurseurs métaboliques situés aux carrefours de nombreuses voies métaboliques (**voir figure 10**). De plus, il a été démontré que l'ajout d'une forte concentration de pyruvate (10 g/L) permet d'augmenter le nombre de colonies de *S. aureus* de près de 20 % (Brewer *et al.*, 1977). Ces deux précurseurs ont été testés dans le milieu TSB dilué de moitié.

a) L'oxaloacétate

Aucun effet causé par ce précurseur métabolique n'a été observé chez *E. coli*, *B. subtilis* et *S. epidermidis*. Chez *M. extorquens*, des concentrations de 250 et 500 mg/L permettent une légère amélioration de la croissance comme le montre la **figure 53**. Une concentration de 100 mg/L semble retarder le passage en phase de la bactérie.

Au vu du faible effet de l'oxaloacétate sur la croissance bactérienne, la molécule n'a pas été ajoutée aux milieux synthétiques.

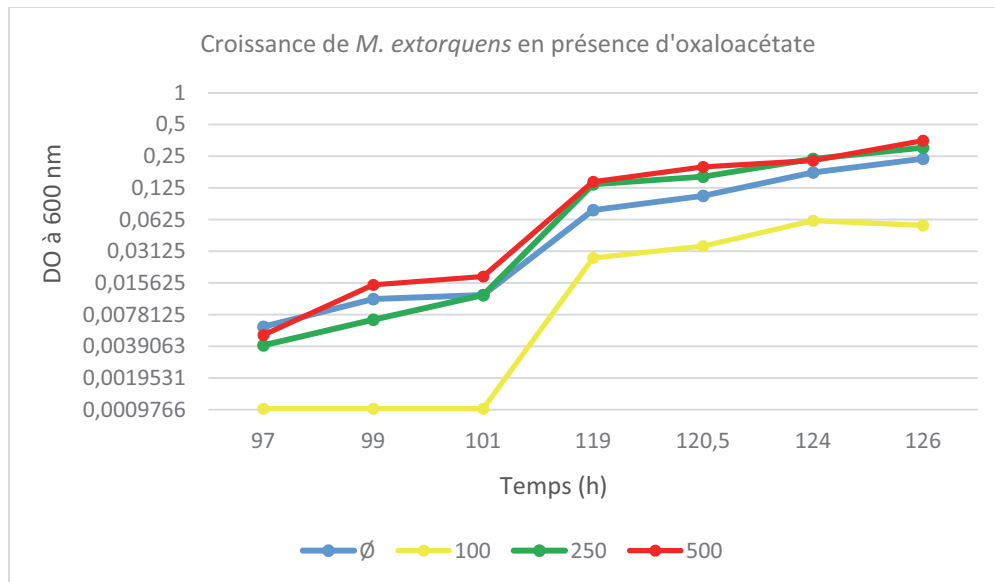


Figure 53 : Croissance de *M. extorquens* dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations d'oxaloacétate. La courbe bleue représente le milieu TSB ½ ; en jaune milieu TSB ½ contenant 100 mg/L d'oxaloacétate ; en vert milieu TSB ½ contenant 250 mg/L d'oxaloacétate ; en rouge milieu TSB ½ contenant 500 mg/L d'oxaloacétate. . N=3, écart-type < 10 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

b) Le pyruvate

Comme pour l'oxaloacétate, l'ajout de pyruvate dans le milieu de culture n'a pas influencé la croissance de *E. coli* ni de *B. subtilis*. Aucun effet n'a été observé chez *S. epidermidis* à toutes les concentrations de pyruvate utilisées hormis à la concentration de 10 g/L A qui affecterait la croissance de la bactérie comme le montre la **figure 54**. Pour le cas de *M. extorquens*, les concentrations de 0,5 et 1 g/L semblent légèrement améliorer la croissance (départ plus rapide) de la bactérie. Cependant *M. extorquens* utilise le pyruvate comme source de carbone. De ce fait, ces résultats ne montrent pas l'intérêt du pyruvate en tant que

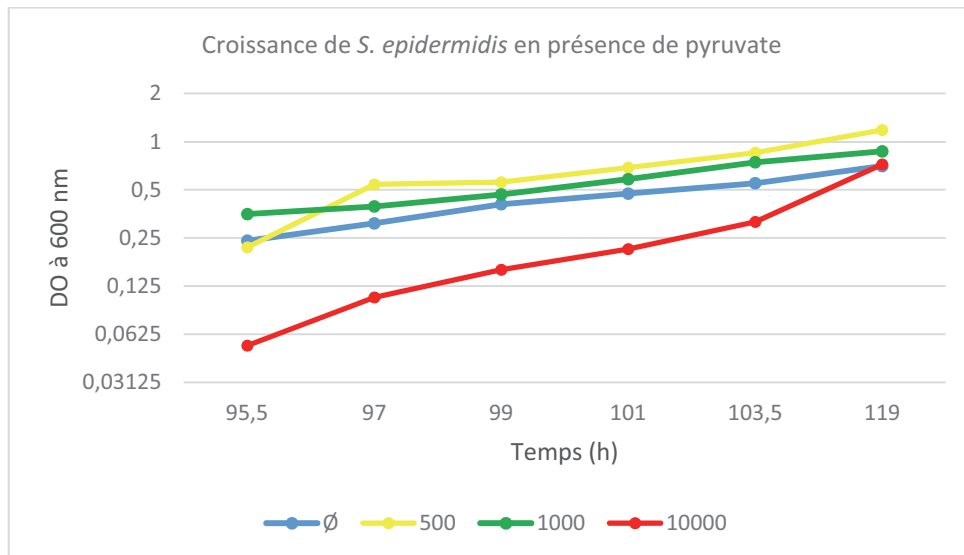


Figure 54 : Croissance de *S. epidermidis* dans le milieu TSB ½ contenant différentes concentrations de pyruvate. En bleu, milieu TSB ½ ; en jaune milieu TSB ½ contenant 500 mg/L de pyruvate ; en vert milieu TSB ½ contenant 1 g/L de pyruvate ; en rouge milieu TSB ½ contenant 10 g/L de pyruvate. N=3, écart-type < 8 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

précurseur métabolique. Ces tests ont démontré que le pyruvate était bénéfique pour la croissance de *M. extorquens*. Le pyruvate étant déjà ajouté au milieu synthétique aérobie en tant que source de carbone pour *M. extorquens* à une concentration de 0,5g/L, cette concentration n'a pas été modifiée.

Notons que dans la publication de Brewer (Brewer *et al*, 1977) il est indiqué que la catalase a également un effet bénéfique pour le développement de *S. aureus*. Cette molécule a également été testée mais aucun effet positif n'a été observé.

IV. Les catécholamines

Les catécholamines sont des molécules dérivées de la tyrosine qui sont sécrétées par les animaux, dont la voie de synthèse est représentée en **Annexe 10** (Freestone *et al.*, 2008). Elles peuvent agir comme neurotransmetteur mais également en tant qu'hormone. Le taux des catécholamines comme l'adrénaline ou la noradrénaline augmente en fonction de l'état de stress de l'organisme. Chez les humains, il a été démontré que l'augmentation du taux de catécholamines stimule la croissance de bactéries pathogènes (Freestone *et al.*, 2008). Les catécholamines amélioreraient l'attachement des bactéries aux cellules hôtes en stimulant la synthèse de pili mais joueraient également un rôle sur leur propre développement. En effet, ces molécules ont une forte affinité pour le fer et permettent de le rendre plus accessible aux sidérophores bactériens, notamment dans le sang, matrice où tout le fer est habituellement associé à des globulines de type transferrine. Les catécholamines favoriseraient également la production d'autoinducteurs par les bactéries. Une autre publication a montré que des catéchols végétaux, molécules similaires aux catécholamines animales, mais ne comportant pas de groupement amine dans la chaîne latérale, amélioreraient la croissance d'entérobactéries comme *E. coli* (Freestone *et al.*, 2007). Afin de vérifier si la structure de base des catécholamines, c'est-à-dire le cycle benzénique 1,2 dihydroxybenzène, ainsi que le cycle avec la chaîne latérale la plus courte (l'acide 3,4 dihydroxybenzoïque) avaient un effet sur la croissance de nos bactéries, ces molécules ont été incorporées au milieu de culture. La dopamine, précurseur de l'adrénaline et de la noradrénaline, a également été testée ainsi que la norépinephrine.

L'incorporation de toutes ces molécules au milieu TSB 1/2 ainsi qu'au milieu MSCoA noircissent ces derniers rendant la mesure de DO impossible. La détection visuelle est quant à elle difficile, les milieux étant très foncés. Ces caractéristiques moléculaires ne permettent pas l'incorporation de ces molécules aux milieux synthétiques, quel que soit leur effet sur la croissance bactérienne. Les catécholamines ont été ajoutées dans des milieux TSA 1/2 et il a été observé que les tailles des colonies étaient plus grosses, notamment pour *M. extorquens*, lorsque la dopamine et le cycle benzénique 1,2 dihydroxybenzène sont à une concentration de 9,5 mg/L. Il est également intéressant de noter qu'une concentration de 1g/L de dopamine ou de norépinephrine inhibe la croissance des bactéries.

V. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires produits par les plantes et sont retrouvés dans l'ensemble du monde végétal. En effet, ces molécules sont présentes dans la majorité des structures végétales notamment dans les fruits, les fleurs, les racines ainsi que les graines. Il existe de nombreuses classes de flavonoïdes ayant chacune des actions spécifiques comme la résistance des cellules végétales aux UV, la coloration des fleurs ou la régulation d'hormones végétales (Taylor and Grotewold, 2005). Les structures de base de la majorité de ces classes sont représentées **Annexe 11**. De nombreuses publications mettent en évidence l'effet antimicrobien des flavonoïdes (Cushnie and Lamb, 2005). Ces molécules auraient comme propriétés d'inhiber la synthèse des acides nucléiques ainsi que le métabolisme énergétique des cellules. Ils réduiraient également la fluidité de la membrane cytoplasmique. Cependant, certains résultats provenant de différentes publications sont contradictoires, cela étant sans doute lié aux méthodes d'analyses utilisées. C'est ainsi que Ulanowska et son équipe ont montré que certains flavonoïdes n'avaient pas le même effet sur la croissance bactérienne selon les concentrations utilisées et que certaines concentrations pouvaient s'avérer bénéfiques (Ulanowska *et al.*, 2007).

Les flavonoïdes peuvent également intervenir lors de la communication plante/bactérie. En effet, lors de la nodulation, ces métabolites jouent un rôle dans toutes les étapes. Ainsi, lors de la première étape, il y a reconnaissance de la plante par la bactérie, grâce à la présence de flavonoïdes. Ces dernières vont alors induire la production de facteurs Nod chez la bactérie. La deuxième étape est l'inhibition du transport d'auxines dans la racine permettant la division des cellules de la plante afin de former le nodule. Enfin, une fois les bactéries à l'intérieur du nodule, les flavonoïdes pourraient à nouveau induire la synthèse du facteur Nod chez les bactéries afin d'augmenter la spécificité de l'interaction (Subramanian *et al.*, 2007). De ce fait, il était intéressant de tester de faibles quantités de flavonoïdes afin de voir si ces molécules peuvent influencer le début de la croissance de bactéries non symbiotiques mais retrouvées dans la phyllosphère comme *M. extorquens*. Pour se faire, trois flavonoïdes ont été testés aux concentrations de 1 ; 10 et 100 mg/L. Il s'agit de la 7-Hydroxy flavone représentant la classe des flavones, de la trans-chalcone représentant la classe des chalcones et de la naringenine représentant la classe des dihydrochalcones. Il s'est avéré que

la croissance était ralentie chez toutes les bactéries et que la concentration de 100 mg/L de chaque molécule inhibait la croissance de *M. extorquens* et de *S. epidermidis*. Le seul effet bénéfique de ces molécules a été observé chez *E.coli* à une concentration de 10 mg/L de chaque molécule comme le montre la **figure 55**.

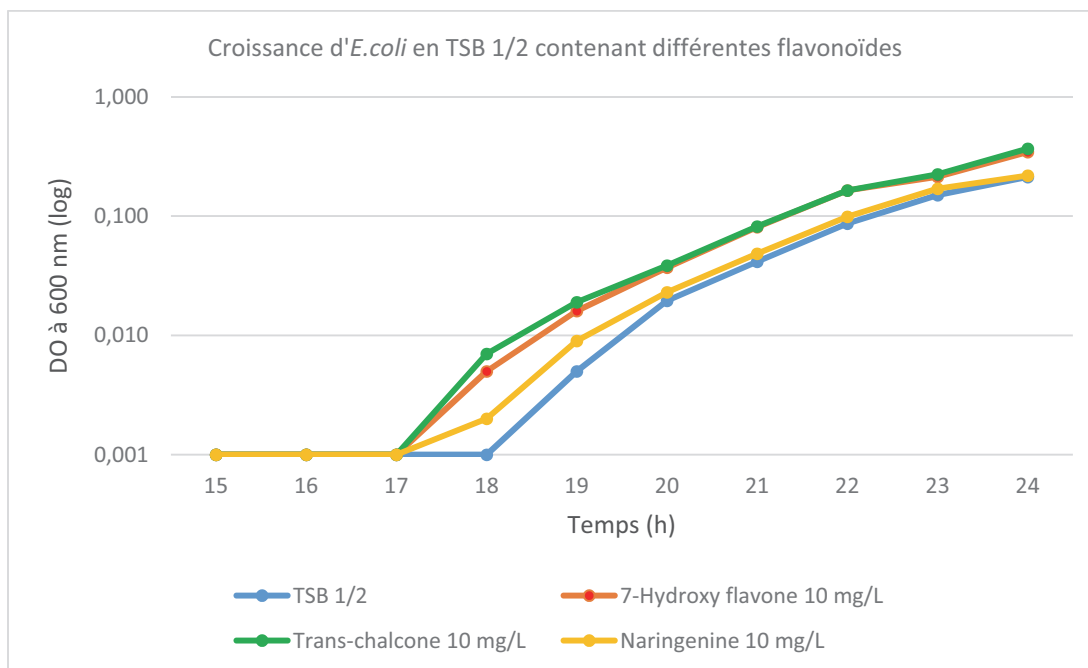


Figure 55: Croissance d'*E.coli* dans le milieu TSB ½ contenant différentes flavonoïdes. N=3, écart-type < 7 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

Suite aux résultats obtenus, aucun flavonoïde n'a été ajouté aux milieux synthétiques.

VI. Les auxines

Les auxines sont des hormones végétales essentielles à la croissance des plantes. Elles interviennent dans la différenciation, la division et l'élongation des cellules végétales (Teale *et al.*, 2006). L'auxine la plus communément retrouvée et la première à avoir été identifiée est l'acide indole 3-acétique (IAA) (voir **Annexe 12**). Ces molécules ne sont pas seulement synthétisées par les plantes mais elles sont également sécrétées par des bactéries dont notamment les Methylobactéries intervenant dans la symbiose avec les plantes hôtes (Ivanova *et al.*, 2001).

Cependant, il n'existe pas d'études sur les effets des auxines sur la croissance bactérienne. Nous avons évalué les effets de trois auxines. Etant donné qu'il était impossible de se procurer de l'acide indole 3-acétique lors des essais, son précurseur, l'acide indole 3-butyrique a été utilisé ainsi que deux auxines de synthèses, l'acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique et l'acide 1-naphtalène acétique (voir **Annexe 12**). Les auxines n'ont pas montré d'effets particuliers sur les bactéries excepté sur *M. extorquens*. Les auxines ont alors été ajoutées au milieu MScCoA afin d'observer plus précisément l'effet de ces molécules. Les résultats ont montré que des concentrations de 1g/L de chaque molécule inhibaient la croissance de *M. extorquens*, phénomène également observé pour une concentration de 100 mg/L pour l'IAA. A la concentration de 10 mg/L, la croissance est accélérée par rapport au

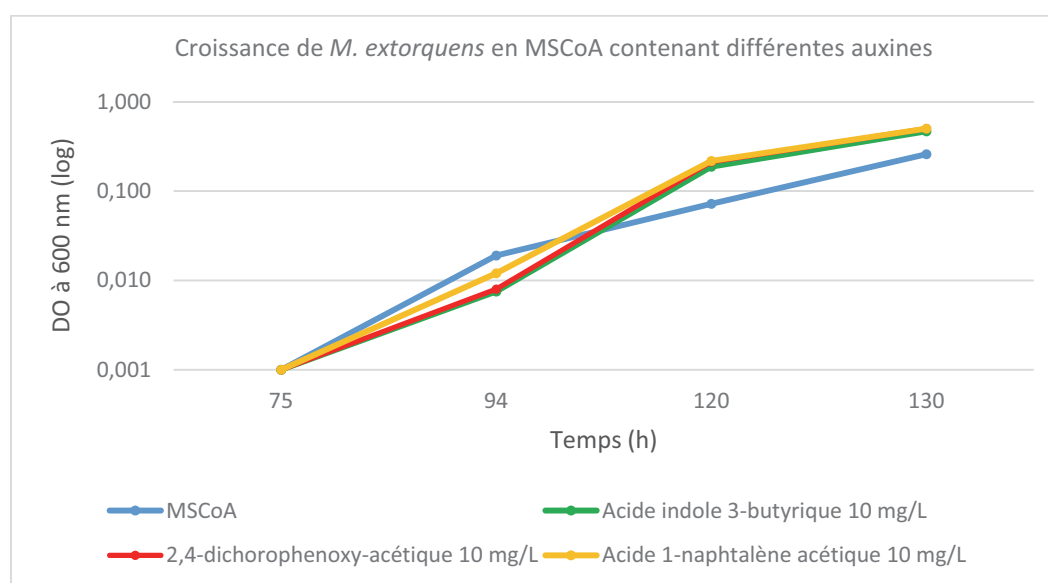


Figure 56 : Croissance de *M. extorquens* dans le milieu MScCoA contenant différentes auxines. . N=3, écart-type < 6 %. Les courbes commencent à 0 à T0.

milieu MSCoA de base (voir **figure 56**). Ces résultats n'ont pas pu être répétés pour le moment et de ce fait aucune auxine ne complète les milieux synthétiques.

VII. Les terres rares

Les terres rares sont des éléments de la classe des métaux comprenant les quinze lanthanides ainsi que le scandium et l'yttrium et sont utilisés pour la fabrication d'appareils électroniques de haute technologie. Peu d'études ont été réalisées sur l'impact de ces éléments sur la croissance microbienne. Ils auraient cependant un effet bénéfique sur les méthylotrophes. En effet, des travaux récents ont montrés que le lanthane augmente l'activité de la méthanol déshydrogénase en jouant le rôle de cofacteur (Nakagawa *et al.*, 2012). Il a également été démontré que chez *Methylacidiphilum fumariolicum* SolV, les terres rares constituent des cofacteurs essentiels et obligatoires de la méthanol déshydrogénase (Pol *et al.*, 2014).

Même si le milieu de culture MSCoA ne contient pas de méthanol comme source de carbone, des molécules de Cérium, Lanthane, Lutécium et Yttrium ont été ajoutées au milieu à différentes concentrations afin d'observer l'impact de ces éléments sur la croissance de *M. extorquens*. Afin de mieux visualiser les résultats, les délais d'obtention d'une valeur de DO de 0.1 en lecteur de plaque sont représentés **tableau 28**.

Concentrations Eléments		1 mg/L	0.1 mg/L	0.01 mg/L
∅	93.5 h	-	-	-
Cérium	-	81,5 h	87 h	93.5 h
Yttrium	-	87,5 h	96 h	96.5 h
Lutécium	-	85 h	96 h	97 h
Lanthane	-	82 h	91 h	96 h

Tableau 28 : Temps nécessaires pour l'obtention d'une valeur de DO de 0.1 en lecteur de plaque Bioscreen de *M. extorquens* dans le milieu MSCoA contenant différentes concentrations de terres rares.

Les résultats montrent que la croissance de bactérie est plus rapide pour toutes les terres rares à des concentrations de 1 mg/L. Les résultats sont moins significatifs pour les autres concentrations. Lors des tests en détection visuelle, tous les milieux ont permis la croissance de *M. extorquens* au bout de 100 heures sauf le milieu contenant le Cérium à une concentration de 1mg/L, dans lequel la biomasse est devenue visible au bout de 96 heures. Ces résultats semblent indiquer que des métaux comme le Cérium ou le Lanthane favoriseraient la croissance de *M. extorquens*. Les tests de ces molécules sur d'autres bactéries n'ont pas encore été effectués. Ces résultats n'étant cependant pas assez significatifs, aucune terre rare n'a été ajoutée aux milieux synthétiques pour le moment.

D'autres molécules comme les homosérines lactones ou les sidérophores, ainsi que d'autres auxines, flavonoïdes ou catécholamines pourraient venir compléter la liste des molécules pouvant potentiellement être intégrées aux milieux de culture. Cependant, ces molécules sont très spécifiques et ne se seraient utilisées que pour améliorer la croissance de bactéries définies.

C. Étude de la survie de micro-organismes dans les systèmes d'eau industriels.

Parallèlement à ce travail de mise au point de milieu de cultures, j'ai participé à une étude visant à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la survie des bactéries dans des systèmes industriels de traitement d'eau. Ces réseaux d'eau industriels sont dotés de systèmes de purification et de décontamination drastiques permettant d'obtenir une eau ultra purifiée. Il arrive cependant que l'on retrouve de manière sporadique des souches microbiennes ayant résisté à ces traitements. Ces bactéries peuvent survivre à un environnement extrêmement pauvre en nutriments. Des études ont montré que cette résistance est liée en partie à la formation de biofilms inter-espèces (Bohus *et al.*, 2011; Bohus *et al.*, 2010; Kawai *et al.*, 2004). Un biofilm est défini comme étant un assemblage de micro-organismes, ADN, protéines et polysaccharides. L'étude des biofilms formés par ces contaminants peut fournir de multiples indications sur la communication de ces espèces entre elles. S'il s'avère que cette communication est basée sur des échanges de métabolites, cela pourrait permettre l'identification de molécules stimulatrices de la croissance bactérienne d'une ou de plusieurs souches. Dans ce cas, de telles molécules présentent un intérêt certain pour compléter un milieu de culture et améliorer la croissance souvent lente de ces contaminants.

Pour réaliser cette étude, différents contaminants bactériens isolés de systèmes industriels de traitement d'eau ont été choisis comme modèle. Il s'agit des bactéries suivantes : *Bradyrhizobium japonicum*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium fujisawaense*, *Methylobacterium radiotolerans* et *Paenibacillus lautus*. Différentes combinaisons de ces bactéries ont été réalisées et analysées en termes de survie et de formation de biofilm. Il en est ressorti que la coculture de *P. lautus* avec certaines espèces de *Methylobacterium* conduit à la production de quantités importantes de biofilm, bien supérieures à celles qui sont synthétisées par les souches séparément. Des études plus approfondies sur l'interaction de ces espèces ont permis de montrer que la présence de *M. extorquens* ou de *M. radiotolerans* influençait de manière significative le phénomène d'essaimage (« swarming », moyen de propagation sur une surface

solide de la bactérie) de *P. lautus*. De plus, *M. extorquens* et *M. radiotolerans* utilisent le système de déplacement de type « autostop » (en anglais hitchhiking). Ces bactéries profitent du swarming de *P. lauteus* pour se déplacer sur une surface solide. Ces résultats mettent en évidence une interaction synergique entre *P. lauteus* les deux souches de *Methylobacterium*. L'analyse métabolomique par chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) a été réalisée afin de déterminer la nature des molécules permettant cette interaction. La comparaison des surnageants de cultures pures, par rapport aux associations de *P. lautus* et *M. extorquens* ou de *P. lautus* et *M. radiotolerans* a permis d'obtenir la liste des molécules consommées et sécrétées par les différentes bactéries. Cependant, ces résultats n'ont pas suffi pour identifier la ou les molécules sécrétées par les deux souches de *Methylobacterium* permettant l'attraction de *P. lautus*. Ces travaux ont permis la rédaction de la publication présentée dans la prochaine partie et qui est actuellement en cours de soumission chez le journal ISME. J'ai contribué dans cette publication à la réflexion et au choix de toutes les manipulations, à la réalisation des manipulations portant sur l'étude du comportement des espèces sur boîte de pétri ainsi qu'aux observations microscopiques.

I. Article soumis pour publication

Bacterial contaminations of ultra pure water by multispecies biofilms: involvement of cooperative social behavior

Jessica Cleiss-Arnold^a, Antoine Gillmann^{a,b}, Nicole Liewig^c, Raphael Lugan^d, Renaud Chollet^b, Marie-Claire Lett^a and Didier Lièvre^a.

^aDépartement Micro-organismes, Génomes, Environnement, Génomique et Microbiologie, UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS, 28 rue Goethe, 67083 Strasbourg Cedex, France

^bMerck Millipore, Development group, Biomonitoring R&D, Lab Solutions, 67124 Molsheim, France

^cInstitut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR 7178 Université de Strasbourg/CNRS, 23 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France

^dPlateforme métabolomique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Plantes, Université de Strasbourg/CNRS, 28 rue Goethe, 67083 Strasbourg Cedex, France

Correspondence: Didier Lièvre, Département Micro-organismes, Génomes, Environnement, Génomique et Microbiologie, UMR7156 Université de Strasbourg/CNRS, 28 rue Goethe, 67083 Strasbourg Cedex, France. Telephone number: (+33) 368 85 19 97.

E-mail: didier.lievre@unistra.fr

Abstract

Microorganisms, including bacteria, yeasts, fungi and algae are able to survive in ultra pure water (UPW), despite the lack of nutrients, when associated in biofilms. A few studies have already focused on the identification of the microorganisms composing UPW biofilms, but little is known about the interactions involved in the formation and the persistence of these complex associations in very oligotrophic environments. In the present work, we investigated the occurrence of social behavior in colonization of nutrients-poor-media, using six bacterial strains isolated from industrial UPW. The bacteria *Paenibacillus lautus*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium fujisawaense* and *Bradyrhizobium japonicum* were cultivated in various combinations. The association of *P. lautus* with either *M. extorquens*, *M. radiotolerans*, or *M. aminovorans* led to strong enhancement of biofilm formation, on both time- and biomass-scale, while no cooperation was observed with *M. fujisawaense* and *B. japonicum*. Moreover, swarming of *P. lautus* on solid media was boosted by *M. extorquens* and *M. radiotolerans*. In return, these two latter bacteria were able to move on solid surface using a hitchhiking strategy based on cargo transport by *P. lautus* swarms. We also found that these microorganisms interact by exchanging a number of metabolites. All these results suggest that such bacterial interspecies cooperation may play a crucial role in the colonization of oligotrophic environments like UPW.

Introduction

Water systems used in pharmaceutical, semi-conductor and food industries are subject to numerous decontamination processes such as reverse osmosis, filtration, UV light treatment and ozonation in order to produce ultra pure water (UPW), characterized by extremely low concentrations of salts and nutrients. However, despite these drastic physico-chemical conditions, UPW can suffer from microbial contaminations (1–5), causing detrimental problems for the quality of the final products as well as microbiologically influenced corrosion (6). Although UPW are very limited in organic (TOC < 3µg/L) and inorganic (conductivity less than 1 µS/cm) nutrients, a wide range of bacteria was detected in these ultra oligotrophic aquatic extreme environments. Various studies reported that some bacteria are able to survive and colonize UPW systems, mainly by the production of biofilms on the surface of the pipes (1, 2, 4). They synthesize extracellular polysaccharides (EPS), which act as a glue to fix the bacteria on the surface of the inner piping, protect them from decontamination processes and concentrate nutrients (4). Previous investigations, based on both cultivation and molecular approaches, have primarily focused on describing the community structure of UPW contaminations. They showed that Gram-negative bacteria, mainly Proteobacteria (e.g. *Bradyrhizobium* sp, *Methylobacterium* sp, *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* spp.) were predominant in these complex microbial communities (1, 2), although Firmicutes including *Paenibacillus*, Actinobacteria, Mycobacteria could be found (3) and even yeasts, microfungi and algae, were detected (4). McAlister *et al.* (7), investigated the survival and nutritional requirements of bacteria in UPW systems. Their results suggest that cryptic growth, based on the utilization of dead biomass as carbon and energy sources, can support the proliferation of oligotrophs in very poor environments. However, by comparison with other complex microbial communities one can hypothesize that the development of these biofilms is not only dependent on the availability of nutrients sources for each individual bacteria, but also on the metabolic and cellular interactions between the members composing such communities. Since various studies detected the presence in UPW of bacteria belonging to the *Paenibacillus* genera, characterized by a remarkable collective behavior (8–10), the aim of this work was to test the hypothesis that cooperative interactions

could also be involved in the survival and dispersal of microorganisms in industrial UPW supply plants. In a recent study, Ingham *et al.* (11) showed that the swarming bacterium *Paenibacillus vortex* was able to promote, *via* specific interactions, the dispersal of conidia (non motile fungal spores) of *Aspergillus fumigatus* over distances up to 30cm, allowing them to be rescued from adverse environmental conditions. In return, fungal mycelia were shown to act as bridges, allowing bacterial cells to cross air gaps in solid medium. In the present work we investigated the occurrence of a social behavior in colonization of very oligotrophic environments by using six bacterial strains isolated from industrial UPW, as models. The bacteria *Paenibacillus lautus*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium fujiisawaense* and *Bradyrhizobium japonicum* were cultivated in oligotrophic conditions in various combinations. Dual-species biofilm community including *P. lautus*, were investigated for the structure of the community (by FISH), for their composition in exopolysaccharides (by lectin staining), for the phenotype on solid surfaces and cometabolism (by GS-MS). We demonstrated a high prevalence of cooperative effect in *P. lautus*-*M. extorquens* or *P. lautus*-*M. radiotolerans* biofilm formation by an enhanced biofilm biomass, co-aggregation, modification of the composition in exopolysaccharides and cometabolism.

Results

Biofilm formation by single-species or multispecies consortia. In order to assess the survival and colonization capacities, we studied the biofilm formation abilities of the six strains isolated from industrial water (Table S3) by the standard CV method. They were incubated as single species in 96-well microtiter plates (replicates of six wells) and biofilm formation was measured after 1 to 7 days. Results presented in Figure S1 show that the four *Methylobacterium* sp. isolates formed biofilm after two days. However the biomass was always lower than $OD_{590nm}=0,50$. In the case of *P. lautus* the biofilm formation ability was observed after six days ($OD_{590nm}max=0,30$). No biofilm was observed with

B. japonicum. According to the method of Stepanović *et al.* (12), classifying bacteria as non-biofilm producer, weak biofilm producer, moderate biofilm producer, or strong biofilm producer, *M. extorquens* and *M. radiotolerans* showed a moderate biofilm producing ability when cultivated between three to seven days, while the biofilms formed either by *M. aminovorans* or *M. fujisawaense* seem to be less stable (moderate then weak biofilm). *P. lautus* formed a weak biofilm after six days and moderate after seven days. Whether in biofilm assay or in planktonic phase this latter bacterium showed a very weak growth in liquid medium. *B. japonicum* presented no biofilm abilities in the conditions and sampling times tested.

All these bacteria were further examined for synergistic effect when they are co-incubated. First, all possibilities of dual-species biofilms were inoculated at a 1:1 ratio and the biomass was quantified (Fig. S2). Two co-cultures (9,5%) were significantly greater biofilm producers (five to six times) than single species biofilms after four days of incubation, i.e. *P. lautus*-*M. extorquens* and *P. lautus*-*M. radiotolerans*. To further test this synergistic effect we selected 20 combinations (including or not *P. lautus*) of three to six strains grown in multispecies biofilm consortia and examined the biomass after four days. The results shown in Figure 1 demonstrated that whatever the number of strains only the combinations including *P. lautus* in association with either *M. extorquens* or *M. radiotolerans* were very effective for the production of biofilm. The maximum was observed in the four species biofilm of *M. radiotolerans*-*M. fujisawaense*-*P. lautus*-*B. japonicum*, which increased 12 times vs single species biofilms. To further examine the properties of these biofilms and the synergistic interactions, while limiting the complexity, we focused the following work on the kinetic of dual-species biofilm including *P. lautus*.

Kinetics and characteristics of dual-species biofilm including *P. lautus*. The kinetic of dual-species biofilms of *P. lautus* with either *M. extorquens*, *M. radiotolerans*, *M. aminovorans*, *M. fujisawaense* or *B. japonicum* was examined. Strains were inoculated at a 1:1 ratio and the biofilm biomass was quantified from day 1 to day 7. Figure S3 shows that the biofilm formation ability is time-dependent,

with a maximum biomass at four days for the following combinations: *P. lautus*-*M. extorquens* and *P. lautus*-*M. radiotolerans*. For *P. lautus*-*M. aminovorans* and *P. lautus*-*M. fujisawaense* biofilms, we observed also an increase in the biomass but the maximum was reached only at six or seven days, respectively. Interestingly, the greatest quantity of biofilm was observed in the combination of *P. lautus*-*M. extorquens* ($OD_{590nm}max = 1,91$), *P. lautus*-*M. aminovorans* ($OD_{590nm}max = 1,92$) and *P. lautus*-*M. radiotolerans* ($OD_{590nm}max = 2,19$). When *P. lautus* was incubated with *M. fujisawaense*, a limited enhancement of biofilm development was observed ($OD_{590nm} = 0,7$) relative to that of each organism alone ($OD_{590nm}max = 0,3$). In the case of the association with *B. japonicum* no enhancement of biofilm formation was observed. As for single biofilms, an equivalent ranking was attributed for dual biofilms. This ranking showed that even if there is variability and a decrease in mass over time, the co-cultures of *P. lautus*-*M. extorquens*, *P. lautus*-*M. radiotolerans* and *P. lautus*-*M. aminovorans* produced always strong biofilms compared to single-species biofilm in which each strain was at maximum a moderate producer. In the case of the combination of *P. lautus* with *M. fujisawaense*, a strong biofilm appeared only after six days. The combination *P. lautus*-*B. japonicum* was found inefficient for the formation of biofilms.

Further, to analyze the structure of dual-species biofilms, for which an enhancement of the biomass was observed and to determine the contribution of each strain to the synergistic interactions, *in situ* investigations were performed on six-day aged biofilm sections. FISH with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for *Methylobacterium* sp. (Cy3) and *Paenibacillus* sp. (Cy5) (Table S1) was used. The images presented in Figure 2 represent examples of the most frequently occurring structural relationships between the two species observed six days after initial colonization. *P. lautus* formed a mixed biofilm when associated with either *M. extorquens* or *M. radiotolerans* and quantitative image analysis indicated that each species was present in almost equal proportions. *P. lautus* made up 55% or 48% of the biofilm while *M. extorquens* and *M. radiotolerans* accounted for 45% and 52% of the biomass in *P. lautus*-*M. extorquens* and *P. lautus*-*M. radiotolerans*, respectively. Interestingly, in the *P.*

lautus-*M.aminovorans* biofilm, *M. aminovorans* was present almost at 99%. Only a very few cells of *P. lautus* could be detected inside the biomass.

To dissect the contribution of individual polysaccharides to the enhancement of the biofilm biomass we quantified the four main sugar families by Lectin staining: N-acetylglucosamine (LEA lectin), α -L-Fucose (UEA-1), D-Glucose/D-Mannose (LcH), D-L-Galactose (PNA) (Table S2). Lectin screening was applied to single- and dual-species biofilms of *P. lautus*, *M. extorquens*, *M. radiotolerans* and *M. aminovorans*. The percentage of each polysaccharide was calculated and the ratios of those signals compared to bacterial cells (FISH counterstaining) were counted and are presented in Table 1. In the case of *M. extorquens* and *M. radiotolerans* single-species biofilms the proportions of polysaccharides were substantially the same: D-Glucose/D-Mannose residues level was the highest ratio detected in these strains; 1,98 and 2,37 in *M. extorquens* and *M. radiotolerans*, respectively, and the three others were lower than 1. In contrast, in *M. aminovorans* the major polysaccharide was the α -L-Fucose with a ratio of 6,5 and the others were close to 1. In the case of *P. lautus*, due to the low quantity of biofilm produced by this bacterium in liquid medium, the percentage of each polysaccharide could not be determined in single species biofilm. However, when *P. lautus* was co-incubated with either *M. extorquens*, or *M. radiotolerans* or *M. aminovorans*, the ratio were significantly different when compared to that obtained with single species biofilms, as shown in Table 1. A largest amount of polysaccharides was detected in the case of *P. lautus*-*M. extorquens* dual-species biofilm. The N-acetylglucosamine, α -L-Fucose and D-Glucose/D-Mannose residues level were two-fold increased. In *P. lautus*-*M. radiotolerans* mixed biofilm, the evolution of the polysaccharide proportion was substantially the same as in *P. lautus*-*M. extorquens*, except for the Mannose (LcH) residues level which was five-fold lower in mixed biofilm than in *M. radiotolerans* biofilm alone. In *P. lautus*-*M. aminovorans*, the highest polysaccharide residues levels were measured for D-Glucose/D-Mannose (LcH) and D-L-Galactose (PNA) which were two-fold increased (ratio 1,66 and 2,58, respectively) compared to *M. aminovorans* alone (ratio 0,93 and 1,32, respectively) and in parallel N-acetyl Glucosamine (LEA) and α -L-Fucose (UEA-1) strongly decreased with a factor greater than six.

Investigation of bacterial interactions for growth and migration of UPW isolates on surfaces. To investigate the potential role of interactions for the growth and migration of UPW on solid surfaces, we checked the ability of each bacterium to influence the growth of another, by using several approaches. The experiments were performed both with the bacteria isolated from the UPW systems and the corresponding ATCC reference strains. As a control the swarming of *P. lautus* was investigated in pure culture. Results showed that this bacterium, whatever its origin, did undergo rapid (after two days) and coordinated translocation across solid medium. Indeed, unlike *P. dentrificiformis* which attempts to swim on hard surfaces, *P. lautus* exhibit some intricate growth pattern known as swarming, like *P. vortex* and *P. alvei* (9, 13). At high concentration of agar (above 1% w/v), multicellular structures were formed, that provide protection and cooperation amongst cells (14) and aggregates of hundreds to thousands of cells were able to detach from the central mass of cells to form satellites colonies and spread as a biofilm over the surface as shown in Figure S4A and S4B. As described by Mangwani *et al.* for the strain NE3B01 (10), light microscopy supported the existence of pleomorphism of *P. lautus* on solid surface. Cells were coccoid in the center of the inoculation spot and at the periphery there was a subpopulation of extremely elongated motile cells to be found within the swarming population (Fig. S4B and S4C). Moreover, by ESEM imaging *P. lautus* had an organized spatial architecture. This technique allowed us to observe that *P. lautus* formed a dense biofilm of rod and coccoid cells joined by a polysaccharide skeleton forming microporosity (Fig. S4D). Remarkably, *P. lautus* exhibited a strong migration toward *M. extorquens* and *M. radiotolerans* and swarmed along the spreading trace (Fig. 3A and 3B). These two latter bacteria caused growth promotion of *P. lautus* when examined by cross-streaking on plates. Indeed, *P. lautus* colonies started movement earlier (after one day vs two days) and spread to greater distances (20mm vs 5mm) compared to control colonies. However, the induction of movement was observed neither with *M. fujisawaense*, *M. aminovorans* nor *B. japonicum*. Additionally, when a droplet, containing about 7.10^5 CFU of *Methylobacterium* sp. was delivered on bacterial mats of *P. lautus*, the result was an earlier and greater growth of the *P. lautus* cells ahead the area of *M. extorquens* and *M. radiotolerans*, compared to *P. lautus* in monoculture, but neither *M.*

fujisawaense, *M. aminovorans* nor a droplet of medium gave this effect. In parallel, co-cultures including equal amounts of the two tested strains were performed on R2A as well as on more oligotrophic media, like R2A diluted at $1/10^e$ or at $1/100^e$, and water with agar. Swarming of *P. lautus* in co-cultures with *M. extorquens* and *M. radiotolerans* began earlier than in pure culture, in R2A but also in more poor environments such as in R2A diluted at $1/10^e$ (5 days vs 15 days), R2A diluted at $1/100^e$ (15 days vs 21 days). Remarkably, on agar plates without nutrients, inoculated either with *P. lautus-M. extorquens* or *P. lautus-M. radiotolerans*, *P. lautus* swarmed after 21 days and formed co-aggregates while the bacteria in pure culture were unable to grow. In each of these investigations, these behaviors were observed both with industrial and references strains.

Swarming of *P. lautus* induces the dispersal of *M. extorquens* and *M. radiotolerans*. *M. extorquens* or *M. radiotolerans* lack the ability to migrate across 1,5% agar plates when grown as pure cultures. However, in cross-streak and co-cultures experiments of *P. lautus*, with *M. extorquens* or *M. radiotolerans*, these two last bacteria began to massively spread on the plates after long incubation (7 days and 10 days, respectively) (Fig. 3B). Direct transport of *M. extorquens* or *M. radiotolerans* by *P. lautus* was observed when the microorganisms were co-inoculated in the center of an R2A plate (Fig. 3C). Pink microcolonies of *M. extorquens*, located a few millimeters from the inoculation area, were found on the top of the biofilm formed by *P. lautus*, showing that cells of *M. extorquens* were transported from the inoculation point on the layer formed by *P. lautus*. In the case of reference ATCC strains the same behavior were observed. These observations were confirmed by environmental scanning electron microscopy (ESEM) imaging. The picture shown in Figure 3D is representative of what was observed with the *P. lautus-M. extorquens* and *P. lautus-M. radiotolerans* co-cultures. Remarkably, *M. extorquens* or *M. radiotolerans* appeared as filed on the rafting biomass of *P. lautus*, while this was not observed with the two other *Methylobacterium* sp. isolates. The metabolic cooperation in the ecosystem of *P.lautus* and *M. extorquens* or *M. radiotolerans* was further investigated.

Metabolic cooperation of *P. lautus-M. extorquens* and *P. lautus-M. radiotolerans*. Metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) was employed to analyze the interaction mechanism of *P. lautus* with *M. extorquens* or with *M. radiotolerans*. A total of 115 metabolites were identified in all the extracts of R2A medium without bacteria. First, 21 or 22 metabolites (representing 18-19% of the total metabolites detected in R2A) were found to be absent or dramatically diminished in extracts of media after *P. lautus* or *M. extorquens* monocultures, respectively (Fig. S5A). *M. radiotolerans* and *M. extorquens* had a common base of 22 substrates consumed, but *M. radiotolerans* used 17 more. The main classes of these common compounds included amino acids (alanine, glycine, serine, asparagine, ornithine...), organic acids (putative pyruvic acid, putative lactic acid, putative glycolic acid...), fatty acid (putative octadecanoic acid) and nitrogenous bases (putative adenine, putative guanine). Then, we studied the metabolites found in the medium after co-culture of *P. lautus-M. extorquens* or *P. lautus-M. radiotolerans*: 39 (corresponding to 36.5% of the metabolites detected in R2A medium) and 48 metabolites (43.5%) were consumed in *P. lautus-M. extorquens* and *P. lautus-M. radiotolerans* co-cultures, respectively. They correspond to all the metabolites consumed by *P. lautus* alone and some of the metabolites consumed by *M. extorquens* or *M. radiotolerans* alone. Interestingly, 33,3% and 14% metabolites were only consumed in *P. lautus-M. extorquens* and in *P. lautus-M. radiotolerans* co-cultures, respectively. Among the newly consumed metabolites there are amino acids (valine, norvaline, threonine), organic acids (putative suberic acid, putative gluconic acid), mineral acids (putative sulfuric acid), fatty acids (putative hexadecanoic acid, putative heptadecanoic acid), putative mannitol, putative uridine... In addition, 14 and 15 metabolites were released by *P. lautus-M. extorquens* and *P. lautus-M. radiotolerans* cocultures, respectively. The metabolites released in co-cultures were either also products found in *P. lautus* monoculture i.e putative isocaproic acid, putative malic acid, putative putrescine, putative xylulose, putative phenylpyruvic acid..., or specific co-culture released metabolites i.e. putative urea, putative benzoic acid, putative Gly-Pro dipeptide... Putative urea and putative Gly-Pro dipeptide were released in both co-cultures but putative benzoic acid, isoleucine and putative glucaric acid were released only by *P. lautus-M. radiotolerans* co-culture.

Finally, as shown in Fig. S5B, *P. lautus* released 37 metabolites, among which 22 were not encountered as products in *P. lautus-M.extorquens* and *P. lautus-M. radiotolerans* cocultures, including putative glyceric acid, putative butyric acid, putative ethanolamine, putative thymine, putative oxaloacetate, putative glucose-6-phosphate, putative norleucine, putative maltose and putative cellobiose.

Discussion

Synergism plays a key role in bacterial survival in UPW systems. In nutrients-poor environments like UPW, microorganisms survive mainly when associated in multispecies biofilms. These complex communities confer increased protection against antibacterial treatments and are involved in the persistence of microbial contaminations despite the harsh environmental conditions. By performing studies on biofilms architecture and their members metabolism, basic knowledge to improve strategies for the manipulation of these biofilms and ultimately innovative and efficient treatment may be gained (15). While various studies have been focused on the formation of multispecies biofilms in nutrients-rich environments, such as oral microbial communities (16) or soil environments (17), knowledge concerning the formation of biofilms in nutrients-poor environments is still very scarce. In this study, we assessed the social behavior of six bacteria: *M. extorquens*, *M. radiotolerans*, *M. aminovorans*, *M. fujisawaense*, *P. lautus* and *B. japonicum* commonly isolated as contaminants in UPW (5, 18). Many of these bacteria isolated from UPW systems are known as intensive exopolysaccharides (EPS) producers. Literature and genome sequence analysis showed that *B. japonicum*, *M. extorquens*, *M. radiotolerans* possess putative genes involved in EPS production (19, 20). Nevertheless, in our study the wild strains, isolated from industrial UPW systems, when cultivated individually, produced either poor or no biofilm in the condition tested. The investigation of various combinations between these six bacteria showed that *P. lautus* associated with any of the three species of *Methylobacterium* sp, namely *M. extorquens*, *M. radiotolerans*, or *M. aminovorans* triggered synergistic interactions involved in biofilm development and structuration. These results are in agreement with those obtained by Ren

et al. with soil bacteria, where they showed that some species unable to form biofilms in isolation, can promote biofilm biomass in mixed-species combinations (17). So, our observations suggest that the synergistic strategy is not a specificity of nutrients-rich environments, but that it occurs also in very oligotrophic conditions. In addition, such behaviors were observed with both industrial UPW strains and with reference strains, suggesting that these traits are inherent to the bacteria and not related to an adaptation mechanism to harsh environments. Moreover, our results demonstrate that the behavior of a single species does not allow prediction and generalization of what happens in mixed biofilm formation. We could observe that some specific strains, despite their poor ability to form biofilms individually, play a leading role in the induction of strong synergy, resulting in the formation of cooperative biofilms. These results confirm also that the investigation of single species biofilm forming ability has no real environmental significance since it does not represent a reliable indicator for the *in situ* development and persistence of biofilms, as already shown by other investigators (17).

These synergistic interactions can result in the development of several beneficial phenotypes, including the promotion of biofilm formation by co-aggregation, metabolic cooperation where one species or more utilize a metabolite produced by a neighboring species. A close association and an equal distribution of *P. lautus* either with *M. radiotolerans* or *M. extorquens* within the biofilm were observed. This formation is called co-aggregation, and was described as vital for both biofilm formation and the existence of certain bacterial species (21). Here, the bacterium *P. lautus* was unable to grow in liquid medium unless co-aggregated with *M. extorquens* or *M. radiotolerans*. *M. extorquens* or *M. radiotolerans* substrates apparently act as environmental cue that facilitate growth and triggers biofilm formation by *P. lautus* in liquid medium. In addition, we demonstrated that EPS are shared resources produced by one species that can be beneficial for others. So in return, we hypothesize that by secreting EPS *P. lautus* bacterium can help *M. extorquens* or *M. radiotolerans* cells and strongly affect the structuration and evolutionary dynamics within biofilms. In contrast, biofilm of *P. lautus* and *M. aminovorans*, *M. fujisawaense* and *B. japonicum* exhibited a different behavior. In *P. lautus*-*M. aminovorans*, despite an enhancement of biofilm formation, the biomass contained only a very few

cells of *P. lautus*, while it was dominated by *M. aminovorans*, suggesting a competitive exclusion of *P. lautus*. In addition the EPS matrix composition was different from *P. lautus*-*M. extorquens* and *P. lautus*-*M. radiotolerans* associations. On this basis it seems that the surface properties of *Methylobacterium* sp. played a role in the interaction with *P. lautus*. Some authors describe biofilms as a balance between competition and cooperation (22). Hansen *et al.* (23) showed that interactions between two species led to a more productive biofilm, not by mutual cooperation but by an increase of the exploitation efficiency of one species. In our studies, a similar observation was done in the case of the association *P. lautus*-*M. aminovorans*. A third type of behavior was observed in the co-incubation of *P. lautus* either with *B. japonicum* or with *M. fujisawaense* where no biofilm was observed, suggesting an absence of interactions. Several studies have already demonstrated that EPS deficient cells were unable to colonize plant roots (24, 25). Our observations have striking similarity to the process of biofilm formation for plant colonization and suggested that we could extend the 'EPS dependence' to the interaction between *Methylobacterium* sp. and *P. lautus*.

Methylobacterium species can be differentiated by their carbon sources utilization profiles: on this basis, *M. extorquens* and *M. aminovorans* profiles are similar among themselves but are different from those of *M. radiotolerans* and *M. fujisawaense* (26, 27). Moreover, studies done by Kato *et al.* (28), based on 16S rRNA gene sequence analyses showed that the *Methylobacterium* species could be divided in two monophyletic groups (sequence similarity values greater than 97%): *M. extorquens* and *M. aminovorans* in group A and *M. fujisawaense* and *M. radiotolerans* in group B. Consequently, the similar behavior between *Methylobacterium* species observed in our experiments is not mirrored by these data, suggesting that the patterns of biofilm induction observed in co-cultures are not due to phylogenetically cohesive traits of these *Methylobacterium* sp. as described in Sher *et al.* (29). This result demonstrates that the effect of one species did not allow prediction and generalization of the exact mechanism of mixed biofilm formation. Each specific strain had an important role for strong synergy induction and indicates that interspecific interactions had led to cooperative biofilm formation by these strains despite a poor ability to form biofilms individually.

Swarming and hitchhiking strategies as social behaviors for UPW systems colonization. Bacteria isolated from UPW systems have been shown to attach and colonize the interior surface of distribution water pipes and to survive to various chemical treatments (30). Solid surface motility, i.e. swarming, is a group behavior which could represent a particular advantage in reaching new territory and for rapid local dispersal. To date, swarming colonies have been mostly studied in monoculture, to type clinical isolates or to identify social, self and non-self recognition factors (31). In this study, growth and swarming of *P. lautus* on solid agar were clearly demonstrated to be modulated by external factors produced by neighboring species: *M. extorquens* or *M. radiotolerans*. The growth rate of *P. lautus* was increased when cultivated with *M. extorquens* or *M. radiotolerans* on Petri plates, and more importantly, *P. lautus* swarming was triggered by both *Methylobacterium* sp. It means that in these growth conditions, the choice of *P. lautus* to be sessile or motile is not self controlled but governed by the neighboring species. As swarming initiation requires a certain cell density, these two processes are coordinated: *M. extorquens* and *M. radiotolerans* induced an increased growth rate of *P. lautus* which allowed the swarming to begin earlier. As the swarming is an energy demanding process, nutrient availability is crucial. Some authors have reported that the chemotaxis sensory system, but not chemotaxis, was important (32, 33). It is confirmed in our experiments as there is no chemical gradient in the Petri plates meaning that chemical signals from *M. extorquens* and *M. radiotolerans* are certainly involved. Moreover, the same experiments were performed in ultra low nutrient media (dilution 1/100^e of R2A medium) and the induction of *P. lautus* swarming was conserved, but delayed in time. Even MilliQ water supplemented with agar supported the growth and swarming of *P. lautus* when co-cultured with either *M. extorquens* or *M. radiotolerans*. To our knowledge, no other study reports a swarming behavior or its induction in these ultra low nutrient conditions since swarming is usually described on nutrient rich substrates.

As mentioned previously, swarming motility represents an advantage to colonize new niches, a powerful mean to facilitate colony spread but a costly trait. Thus, *M. extorquens* and *M. radiotolerans* triggered the adoption of a costly group behavior in *P. lautus* population. In return, *M. extorquens* or

M. radiotolerans, non swarmer and weakly motile, used the swarming of *P. lautus* to be transported as observed in ESEM pictures. The swarming behavior of *P. lautus* becomes a vector of dispersal for both *Methylobacterium* species. We may hypothesize that in UPW nutrient deficient systems, like in extreme environments, translocation is an essential ability to allow the bacteria to disperse themselves and to reach more favorable niches increasing their survival rate. The hitchhiking of *M. extorquens* and *M. radiotolerans* by *P. lautus* represents an interspecies cooperative social behavior. These cooperative behaviors are observed usually with closely related species, due to the self and non-self recognition mechanisms. Categorizing microbe-microbe interactions is not an easy task but our observations of these cooperative behaviors could be interpreted as facultative mutualism since the two species derive benefit from each other even if both species can live alone. These mutualistic phases may appear under specific circumstances *e.g.* in extreme environments such as UPW systems, allowing both species to cope with the biotic and abiotic parameters in order to survive. It is also important to note the spatio-temporal dynamic of the relationship illustrated here: close cellular proximity or contact between the two strains is not required in the initial phase as signal compounds involved are certainly diffusible in the agar medium. A time delay is thus observed before the response *i.e.* accelerated growth and swarming movement toward the attractant bacteria. This time delay was shown to depend on the level of nutrients in the culture medium. Finally, the dispersal of the two hitchhiking *Methylobacterium* species through swarming *P. lautus* can take place with the two species encounter. In this phase, the two species are again in close proximity. This is consolidated by the remarkable architecture of the biofilm of *P. lautus*, organized in a honeycomb-like network surrounded by water filled voids, where EPS served to bond and bridge the bacterial cells together as well as provided a structural support. Clearly, in such relationship a close proximity of the participating organisms maximize the efficiency of the consortium by allowing intense interactions, including cell-cell communication and the formation of synergistic microconsortia. The hitchhiking phenomenon has been described recently in the co-culture of Xanthomonads, which rely on high relative humidity for movement, with the motile *P. vortex*: the former bacteria attracts the latter one, inducing its surface-

motility and takes advantage for its own dispersal on solid surfaces (34). Our experiments make a step further, as the bacteria used were isolated from UPW systems and were weakly motile. All these findings demonstrated that this phenomenon is not an isolated case but occurs without doubt in several environments, raising new questions regarding the mechanisms that govern surface motility and its ecological roles.

Finally, a metabolic cooperation was highlighted by the detection of specific released metabolites and consumed substrates in *P. lautus*–*M. extorquens* and *P. lautus*–*M. radiotolerans* co-cultures. In this study, one of the most pronounced changes in the evolved co-culture was the increase of the metabolites from amino acids metabolism, glycolysis and TCA cycle, which was in agreement with energy conservation strategy of cells. Putative benzoic acid, isoleucine, putative glucaric acid and putative urea were specifically released in the enhanced combinations, suggesting that *M. extorquens* and *M. radiotolerans* interacting with *P. lautus* activate specific metabolic pathways, which are not completed by *M. aminovorans* or *M. fujisawaense* metabolic capacities. We speculated that the specific extracellular metabolites of *M. extorquens* or *M. radiotolerans* could be chemo-attractants for *P. lautus*. However, all our assays using several concentrations either of phenylalanine or of gluconic acid were unsuccessful for the attraction of *P. lautus*. In Hagai *et al.* (34), the authors suggested that the effect of *X. perforans* on *P. vortex* surface motility was mediated by an airborne substance. In our system, the induction of movement did not occur when *P. lautus* and *M. extorquens* or *M. radiotolerans* were separated by a plastic barrier, suggesting that no volatile organic compound was implicated in the observed interaction.

In conclusion, this study clearly shows that there are new lessons in microbial interactions to be learnt from mixed-biofilm community social behaviors studies, as they are good representations of how bacteria co-exist and co-survive in extreme systems. Extreme environments such as UPW constitute important survival challenges for bacteria. Usually, it is admitted that in a given

environment, only the “fittest” organisms survive and as a consequence, expending energy for the benefit of the “other” bacteria is not favored. However, our results suggest that in an UPW environment the mean fitness of the whole community makes more sense than the sole development of the fittest organism. In other words, collective and cooperative behaviors represent a smart answer in extreme environments, involving the emergent properties of the new collective system i.e. the bacterial community. Following Aristotle’s postulate, the emergent, the new properties of the system resulting from the interactions between each member cannot be deduced from the individual properties of each member: “The whole is more than the sum of the parts“. Bacterial social interactions, both within and between species, are fundamental drivers of ecological systems. In ultra low nutrient water systems, survival of bacteria is stressful and requires the social cooperative behaviors of all the bacterial partners present: in such poor conditions, competition between bacterial species appears as less successful compared to cooperation. Our study showed that both mechanisms of biofilm formation as well as induction of swarming play important roles and are closely linked. Induction of biofilm protected bacteria whereas the weakly motile hitchhiker bacteria attracted its bacterial vector in order to be dispersed. The precise nature of the cooperation and the understanding of this sophisticated behaviors are being investigated with ‘omics’ approaches. Moreover, the identification of the facultative mutualism chemo-attractants signals is currently under progress.

Materials and methods

Biomass quantification, FISH and Lectin staining of biofilm. The cultures were diluted with fresh R2A liquid medium to 3×10^4 cells/ml. Each strain was tested with six replicates of 200 μ l in two flat-bottomed polystyrene 96-well microtiter plates (Nunc). Biofilm formation was quantified using crystal violet, as previously described (35). For FISH, briefly, 2 ml of samples of 6 days biofilm was pelleted, resuspended in 250 μ l of PBS and 750 μ l of 4% (w/v) paraformaldehyde and fixed for 3h. The fixed cells were resuspended in 50% (vol/vol) ethanol and incubated at room temperature for 5 min. This step

was repeated twice with 80% and 95% ethanol. The cells were resuspended in 500 μl of 1X PBS and 500 μl of cold 100% ethanol and stored at -20°C . Subsequently, the 2mL of the fixed cells aliquot was pelleted by centrifugation, resuspended in 200 μl of hybridization solution 5M NaCl, 1M TrisHCl (pH 7,4), Formamide concentration referred in Table S1 and SDS 0.1% and incubated 30 min at 37°C . An aliquot of 50 μl was then incubated with 200 nM of oligonucleotide probe. The samples were incubated at 65°C for 3 h. LEA, UEA-1, LcH and PNA lectins staining were carried out as described by Zippel et Neu (36).

Sampling and extraction of metabolites. After five days, the agar under the colony was cut and washed twice with ultrapure water. The water phase containing all hydrophilic metabolites was lyophilized at a low temperature (-55°C). 50 μL of a pyridine solution was added, containing 20mg/mL of methoxyamine hydrochloride and 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of a 2mg/mL n-alkanes mixture (retention index standards : decane, dodecane, pentadecane, octadecane, nonadecane, docosane, octacosane, dotriacontane and hexatriacontane). The tubes were sealed and heat up to 40°C for 90 min. Then 80 μL of N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide was added for silylation to perform during 30 min at 40°C . Analysis were performed by gas chromatography (Agilent 6890) and quadrupole mass spectrometry with electron impact ionization (Agilent 5973 Network). A volume of 1 μL was injected on an Agilent J&W HP-5ms column (diameter: 0.25mm, film thickness : 0.25 μm , length : 30m) with a 0.6mL/min helium flow. The injection parameters were: splitless injection at 230°C with a purge after 1 minute at 20mL/min. The temperature gradient was: 1min at 70°C ; 9°C min until 320°C then 10 min at 320°C , and the solvent delay was 5.4 min. The source was set to 250°C and 70eV, scanning at 2 scans/min, from 70 to 600 m/z. Acquisition was performed with the Chemstation software (Agilent, Santa Clara, USA). Semi-automated integration of chromatograms was performed with the Quanlynx software (Waters, Milford, USA) after conversion of the raw data into NetCDF format. A model ion was chosen manually to perform a correct integration with the following criterions: Gaussian shape, high relative abundance in the mass spectrum and absence of saturation in any sample. Metabolites were

annotated on the basis of both spectral and retention index matches with public database (37). Data were then normalized and centered for further analysis.

Acknowledgements

The six industrial isolates were obtained from Merck Millipore Group, Molsheim, France. A.G was supported by a grant from the Conventions Industrielles de Formation par la Recherche (CIFRE) and J.C-A from the Université de Strasbourg.

References

1. Kulakov LA, McAlister MB, Ogden KL, Larkin MJ, O'Hanlon JF (2002) Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Appl Environ Microbiol* 68(4):1548–1555.
2. Kawai M, Yamagishi J, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M (2004) Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J Appl Microbiol* 97(6):1123–1131.
3. Bereschenko LA, et al. (2008) Molecular characterization of the bacterial communities in the different compartments of a full-scale reverse-osmosis water purification plant. *Appl Environ Microbiol* 74(17):5297–5304.
4. Bohus V, et al. (2010) Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Water Res* 44(20):6124–6132.
5. Bohus V, et al. (2011) Bacterial communities in an ultrapure water containing storage tank of a power plant. *Acta Microbiol Immunol Hung* 58(4):371–382.
6. Coetser SE, Cloete TE (2005) Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Crit Rev Microbiol* 31(4):213–232.
7. McAlister MB, Kulakov LA, O'Hanlon JF, Larkin MJ, Ogden KL (2002) Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. *J Ind Microbiol Biotechnol* 29(2):75–82.
8. Be'er A, Florin E-L, Fisher CR, Swinney HL, Payne SM (2011) Surviving bacterial sibling rivalry: inducible and reversible phenotypic switching in *Paenibacillus dendritiformis*. *MBio* 2(3):e00069–00011.
9. Ingham CJ, Ben Jacob E (2008) Swarming and complex pattern formation in *Paenibacillus vortex* studied by imaging and tracking cells. *BMC Microbiol* 8:36.

10. Mangwani N, Kumari S, Shukla SK, Rao TS, Das S (2014) Phenotypic switching in biofilm-forming marine bacterium *Paenibacillus lautus* NE3B01. *Curr Microbiol* 68(5):648–656.
11. Ingham CJ, Kalisman O, Finkelshtein A, Ben-Jacob E (2011) Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus vortex*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(49):19731–19736.
12. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 40(2):175–179.
13. Tcherpakov M, Ben-Jacob E, Gutnick DL (1999) *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1:239–246.
14. Kearns DB (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* 8(9):634–644.
15. Parsek MR, Greenberg EP (2005) Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* 13(1):27–33.
16. Jefferson KK (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* 236(2):163–173.
17. Ren D, Madsen JS, Sørensen SJ, Burmølle M (2014) High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME J*.
18. Kéki Z, Grébner K, Bohus V, Márialigeti K, Tóth EM (2013) Application of special oligotrophic media for cultivation of bacterial communities originated from ultrapure water. *Acta Microbiol Immunol Hung* 60(3):345–357.
19. Becker BU, Kosch K, Parniske M, Müller P (1998) Exopolysaccharide (EPS) synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: sequence, operon structure and mutational analysis of an exo gene cluster. *Mol Gen Genet* 259(2):161–171.
20. Marx CJ, et al. (2012) Complete genome sequences of six strains of the genus *Methylobacterium*. *J Bacteriol* 194(17):4746–4748.
21. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS (2003) Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol* 11(2):94–100.
22. Nadell CD, Xavier JB, Foster KR (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 33(1):206–224.
23. Hansen AA, et al. (2007) Viability, diversity and composition of the bacterial community in a high Arctic permafrost soil from Spitsbergen, Northern Norway. *Environmental Microbiology* 9(11):2870–2884.
24. Chen Y, et al. (2013) Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ Microbiol* 15(3):848–864.
25. Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(17):E1621–1630.

26. Green PN, Bousfield IJ, Hood D (1988) Three new methylobacterium species: *M. rhodesianum* sp. nov., *M. zatmanii* sp. nov., and *M. fujisawaense* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38(1):124–127.
27. Urakami T, Araki H, Suzuki K-I, Komagata K (1993) Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43(3):504–513.
28. Kato Y, Asahara M, Arai D, Goto K, Yokota A (2005) Reclassification of *Methylobacterium chloromethanicum* and *Methylobacterium dichloromethanicum* as later subjective synonyms of *Methylobacterium extorquens* and of *Methylobacterium lusitanum* as a later subjective synonym of *Methylobacterium rhodesianum*. *Journal of General and Applied Microbiology* 51(5):287–299.
29. Sher D, Thompson JW, Kashtan N, Croal L, Chisholm SW (2011) Response of *Prochlorococcus* ecotypes to co-culture with diverse marine bacteria. *ISME Journal* 5(7):1125–1132.
30. Vess RW, Anderson RL, Carr JH, Bond WW, Favero MS (1993) The colonization of solid PVC surfaces and the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *J Appl Bacteriol* 74(2):215–221.
31. Gibbs KA, Urbanowski ML, Greenberg EP (2008) Genetic determinants of self identity and social recognition in bacteria. *Science* 321(5886):256–259.
32. Harshey RM (2003) Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu Rev Microbiol* (57):249–73.
33. Sar N, McCarter L, Simon M, Silverman M (1990) Chemotactic control of the two flagellar systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology* 172(1):334–341.
34. Hagai E, et al. (2014) Surface-motility induction, attraction and hitchhiking between bacterial species promote dispersal on solid surfaces. *ISME J* 8(5):1147–1151.
35. Hommais F, et al. (2002) Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. *Proteomics* 2(5):571–579.
36. Zippel B, Neu TR (2011) Characterization of glycoconjugates of extracellular polymeric substances in tufa-associated biofilms by using fluorescence lectin-binding analysis. *Appl Environ Microbiol* 77(2):505–516.
37. Kopka J, et al. (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* 21(8):1635–1638.

Lectin	N-acétylglucosamine (LEA)	L-Fucose (UEA-1)	D-Mannose and D-Glucose (LcH)	Galactose (PNA)
Bacterial strain				
<i>M. extorquens</i>	0,46	0,36	1,98	0,64
<i>M. radiotolerans</i>	0,54	0,45	2,37	0,82
<i>M. aminovorans</i>	1,26	6,5	0,93	1,32
<i>P. lautus</i> + <i>M. extorquens</i>	0,82	1,02	3,38	0,73
<i>P. lautus</i> + <i>M. radiotolerans</i>	0,89	0,84	0,49	0,47
<i>P. lautus</i> + <i>M. aminovorans</i>	0,15	1,03	1,66	2,58

Table 1 Ratio of the FITC-tagged lectins relative to the fluorescently cells

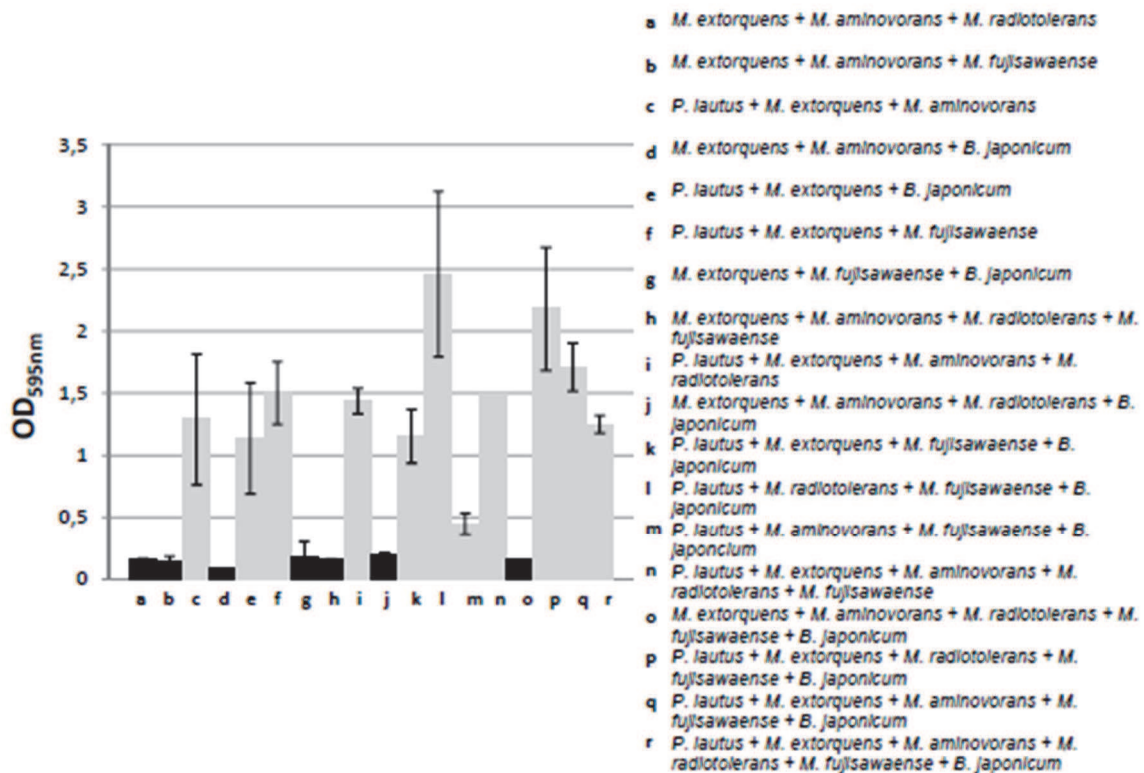


Fig. 1. Multi-species biofilm biomass of the 20 selected associations of two to six strains. Black bars= without *P. lautus* and grey bars= with *P. lautus*. The means \pm standard deviations for at least four replicates are illustrated.

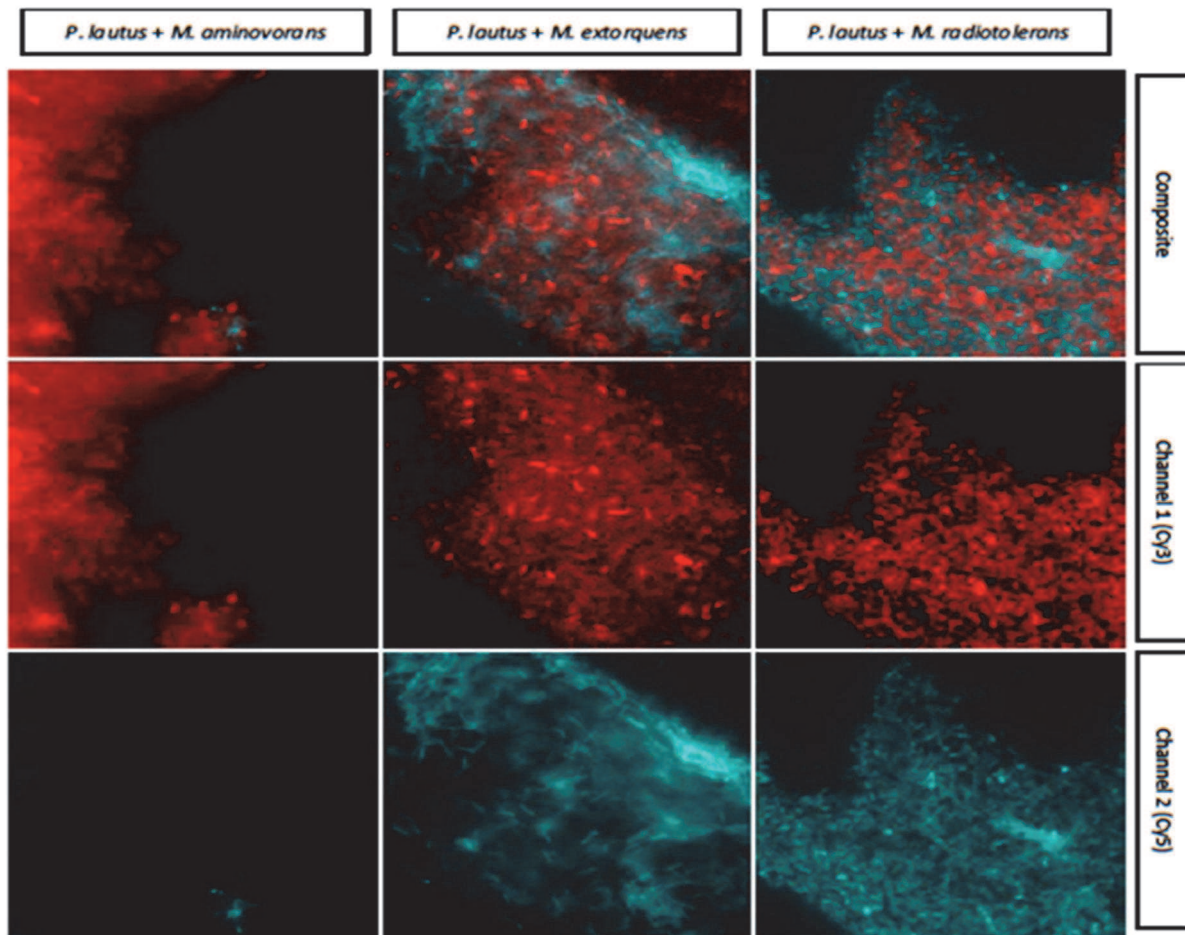


Fig. 2. Fluorescent in situ hybridization images of dual-species biofilm of *P. lautus* and *Methylobacterium* sp. Channel 1 represents the Cy3 probe specific to *Methylobacterium* sp. and channel 2 the Cy5 probe specific to *P. lautus*. Composite image was obtained by merging these two channels.

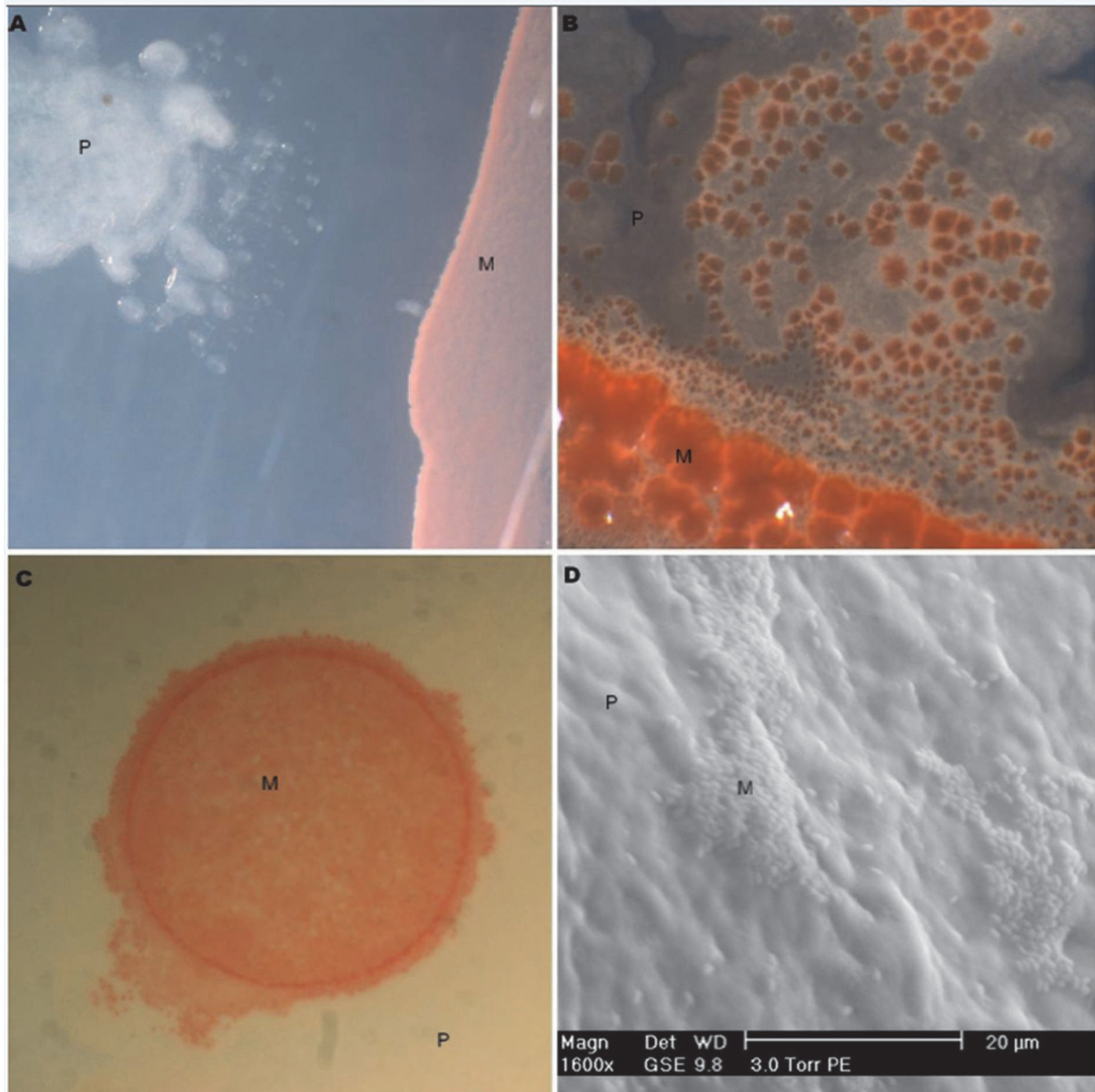


Fig. 3. Experiments showing the ability of *P. lautus* to swarm towards and along the trace of *M. extorquens* (A,B) and dispersal of this earlier on the biofilm of *P. lautus* (B, C and D). A, B and C were observed with a magnifying glass at X1.6, X2 and X2.5, respectively. ESEM observation in d. was made with a magnification of X1600. P: *P. lautus* and M: *M. extorquens*.

Supporting Information

SI Materials and Methods

Strains and Culture. The bacteria *Paenibacillus lautus*, *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Methylobacterium aminovorans*, *Methylobacterium fujiisawaense* and *Bradyrhizobium japonicum*, used as models, have been previously isolated from different industrial UPW systems, including pharmaceutical and food companies. They were cultivated on R2A (R2 solid agar) or R2B (R2 broth) media at 22.5°C and identified on the basis of their 16S rRNA gene sequence. The corresponding reference species were obtained from the ATCC collection (Table S3). Bacterial cells were grown in 50 mL of R2B at room temperature under agitation (150rpm) for 1 to 7 days. For plating tests bacteria were grown on R2A plates containing 1,5% agar. (i) **Cross-streak assay:** Cell suspensions of each bacterium were cross streaked perpendicularly against each other on R2A plates at a distance situated between 0,5 and 0,8 cm, allowing them to migrate and interact. (ii) **Spot inoculation assay:** The spot inoculation assay was performed by spreading the tester strain on R2A plates before spotting 5 µl aliquot of target strain. (iii) **Co-inoculation:** cell suspensions of each co-culture were spotted (5 µl) together on R2A plates. After incubation the appearance and growth of the inocula and the dispersion of the (co-)cultures were analyzed. For biofilm quantification, after removing the culture medium, wells were gently rinsed with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), dried at 55 °C for 25 min, then 200 µl of 0.1% [w/v] crystal violet solution (Merck) was added to the wells and the plates were incubated at 30 °C for 30 min. Free crystal violet was removed and wells were washed three times with PBS. Plates were dried at room temperature and the biofilm was subsequently dissolved in 200 µl of 95% [v/v] ethanol over 30 min. Finally, the absorbance was read at 595 nm with a microplate reader (Model Synergy HT; BIO-TEK). Bacteria were classified using the scheme of Strepanović et al. (12) as follows : non biofilm producer (0), OD less than or equal to OD_c; weak biofilm producer (+), OD greater than OD_c and less than or equal to 2 X OD_c; moderate biofilm producer (++) , OD greater than 2 X OD_c and less than or equal to 4 X OD_c; strong biofilm producer

(+++), OD greater than 4 X OD_c. This classification was based upon the cutoff OD (OD_c) value, defined as three standard deviation values above the mean OD₅₉₅ of the negative control.

FISH and Lectin staining of biofilm. Oligonucleotide DNA probes, labeled at the 5'-end with Cy3, Cy5 or fluorescein (FITC), were purchased from MWG operon Eurofins (Eurofins genomics, France) and are listed in Table S1. Appropriate probe sequences for the specific detection of each biofilm strain were retrieved at probeBase (34). EUB338 served as a positive control in specificity and permeability tests (35). The lectins were fluorescently tagged with FITC and were obtained from EY (San Mateo, California, USA) (Table S2).

Microscopy and image acquisition. Bacteria on plates were observed with a Leica Z6APO magnifying glass and recorded on a Leica DFC300FX camera. Fluorescently stained cells and EPS were visualized using a Zeiss Axio Observer microscope equipped with a HBO 100 lamp for fluorescence microscopy and HAL 100 lamp for light microscopy. 100X (Alpha Plan-Fluar 100X/1,45 oil) objective was used and the different fluochromes were selectively observed using Zeiss filter sets 49 for DAPI (blue), 13 for FITC (green), 43 for Cy3 (orange-red) and 50 for Cy5 (red). DIC/Normaski 100X objective was used for light microscopy. Images of biofilms were recorded on a coolsnap-hq2 camera using Axiovision4 software. Digital image analysis was performed using the ImageJ software (available at <http://imagej.nih.gov/ij/>) developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). For transmission electron microscopy (TEM) the bacteria grown on agar plate were resuspended in water and dried over Formvar-coated nickel grids. Grids were examined using a Hitachi 600 transmission electron microscope at 75 kV and photographed using a Hamamatsu ORCA-HR camera (Hamamatsu City, Shizuoka, Japan) with the AMT software (Advanced Microscopy Techniques Corp., Danvers, MA). For environmental scanning electron microscopy (ESEM), observations were performed in a Philips XL 30 ESEM Microscope in an environment of water vapor at 3 torr.

Table S1. 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes used in this study.

Probe	Specificity	Target site ^a	Sequence (5'-3')	Label	Formamide (%) ^b
EUB338	Domain <i>Bacteria</i>	338-355	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FITC or Cy3	0-50
MB	<i>Methylobacterium</i> sp.	1388 - 1404	AGCGCCGTCGGGTAAGA	Cy3	30
LGC354B	Firmicutes (Gram-positive bacteria with low G+C content)	354 - 371	CGGAAGATTCCTACTGC	FITC or Cy5	35

Table S2. Specificities of the lectins used in this study to detect surface exposed glycoconjugates in biofilms.

Description	Specificities
<i>Lycopersicon esculentum</i> lectin (LEA)	N-Acétylglucosamine: GlcNAc β (1,4) GlcNAc oligomers
<i>Lens culinaris</i> lectin (LcH)	D-Mannose, D-Glucose, fucose linked to chitobiose core of oligosaccharide
<i>Ulex europaeus</i> lectin (UEA-1)	α -L-Fucose
<i>Arachis hypogaea</i> lectin (PNA)	L-Galactose, Gal(β 1,3)GalNAc

Table S3. List of the organisms included in the study, closest relative of the six UPW isolates by 16SrRNA analysis and the references.

GenBank accession no.	Closest relative ¹
KP186140	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
KP186141	<i>Methylobacterium aminovorans</i>
KP186142	<i>Methylobacterium extorquens</i>
KP186143	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>
KP186144	<i>Paenibacillus lautus</i>
KP186145	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
References	Name
ATCC4366	<i>Methylobacterium extorquens</i>
ATCC27329	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>
ATCC43898	<i>Paenibacillus lautus</i>
ATCC10324	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>

¹ The sequences had 98 to 100% base identity to the closest relative in GenBank

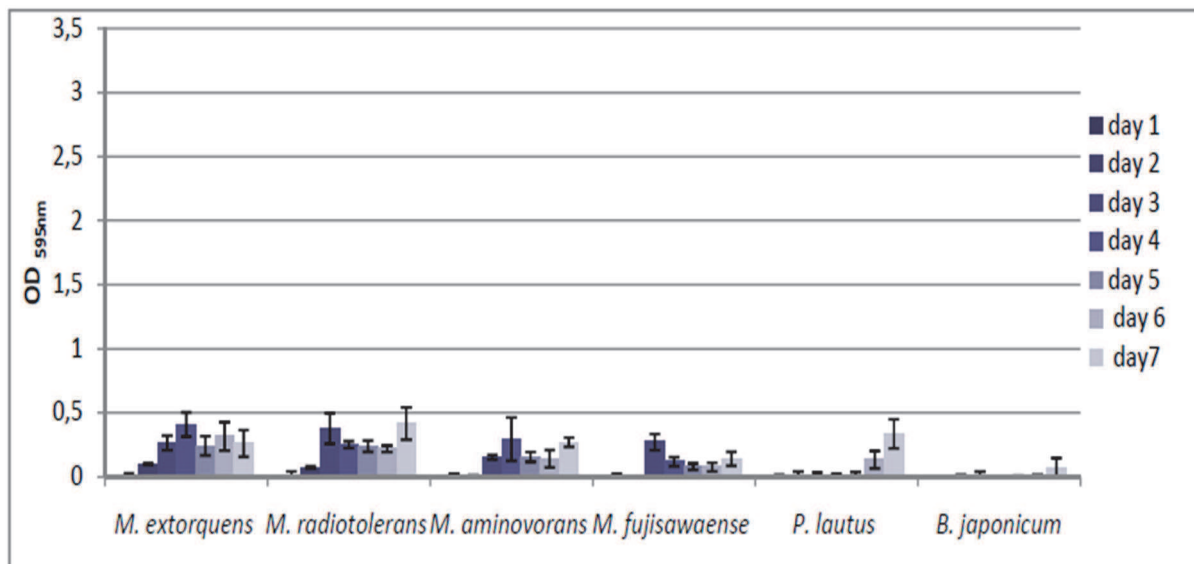


Fig. S1. Kinetics of single-species biofilm biomass (OD_{595nm}). The means ± standard deviations for four replicates are illustrated.

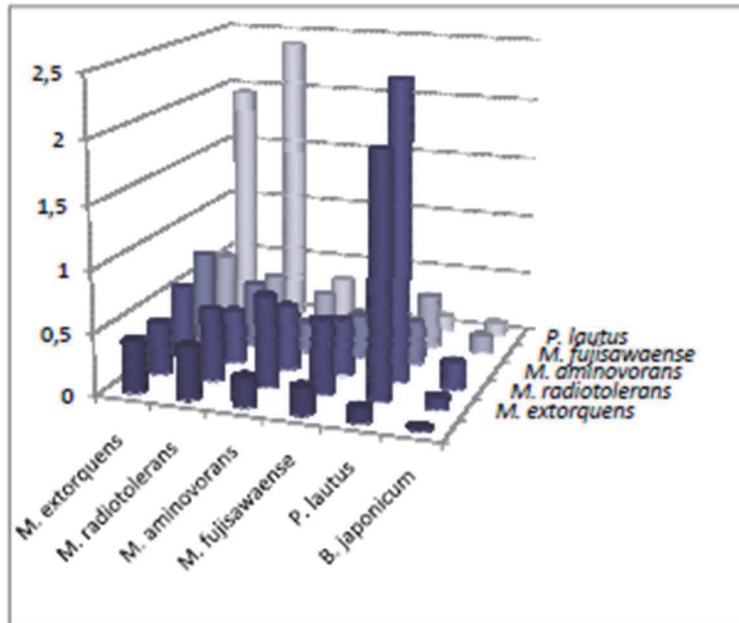


Fig. S2. Multi-species biofilm biomass of all dual-species biofilm combinations.

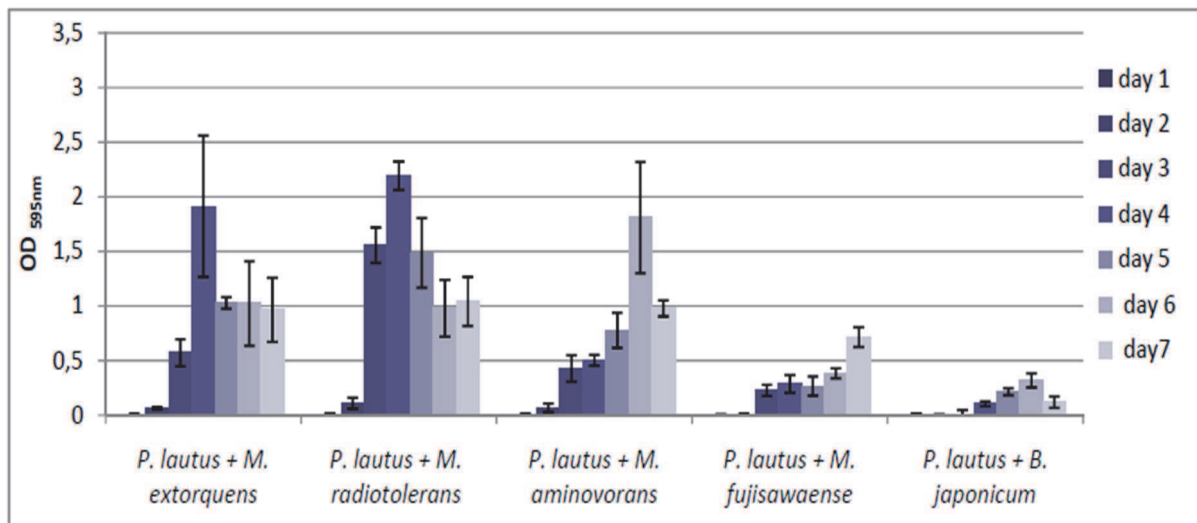


Fig. S3. Kinetics of dual-species biofilm biomass (OD_{595nm}). The means ± standard deviations for four replicates are illustrated.

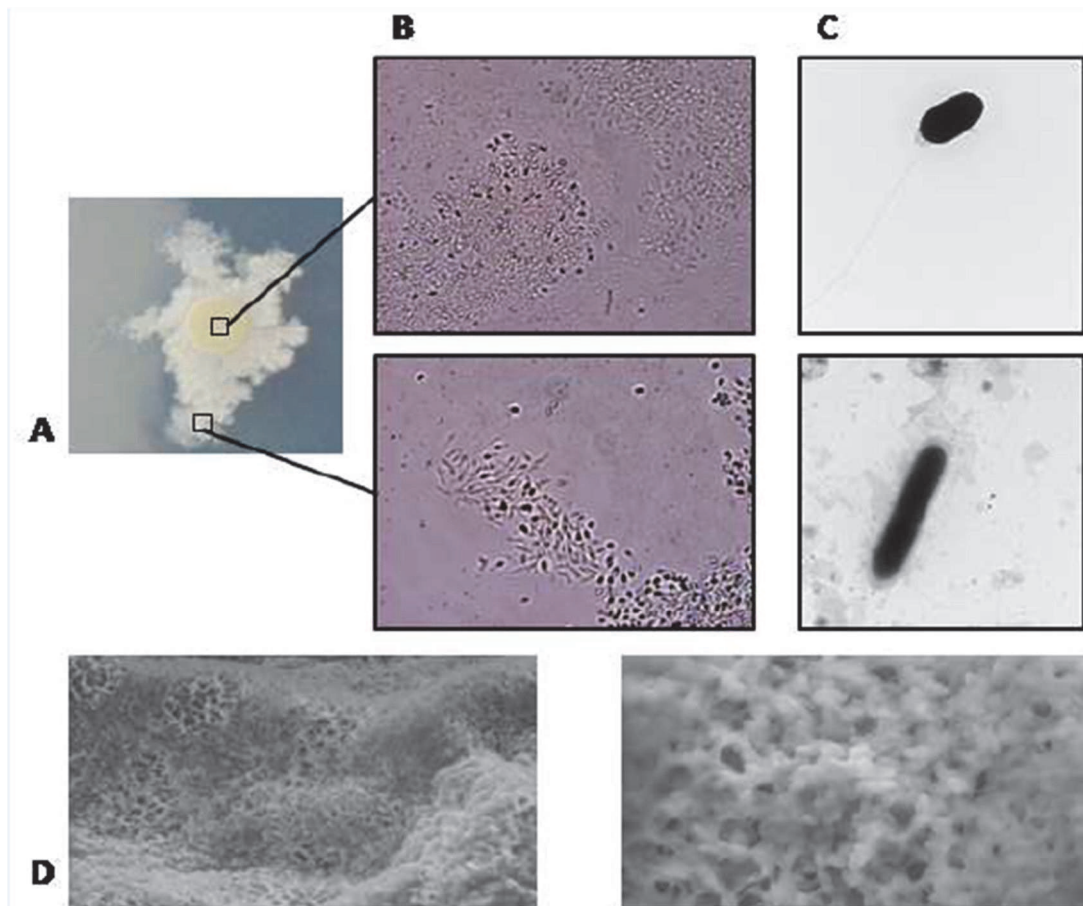


Fig. S4. *P. lautus* swarming motility observed with the magnifying glass (A), in light (B) transmitted electron microscopy (C) or ESEM (D). Magnifying glass, MO and MET magnification were $\times 2,5$ $\times 1000$ and $\times 20000$, respectively. The two ESEM micrographs were obtained by gradual zoom in the center of the image: 800X and 3000X.

A.	<i>P. lautus</i>	<i>P. lautus</i> + <i>M. extorquens</i>	<i>M.</i> <i>extorquens</i>	<i>M.</i> <i>radiotolerans</i>	<i>P. lautus</i> + <i>M. radiotolerans</i>
Guanine					
Pyruvic acid					
Alanine, DL-					
Isoleucine, DL-					
Serine, DL-					
Methionine, DL-					
Aspartic acid, DL-					
Ornithine, DL-					
Glutamic acid, DL-					
Arginine, DL-, -NH ₃					
Leucine, DL-					
Fructose					
Mannose, D-					
Tyrosine, L-					
[NA]					
D-Galactono-1,4-lactone					
Ribitol					
Inositol, myo-					
DL-Tryptophan					
Lactic acid, DL-					
Glycolic acid					
Glycine					
Succinic acid					
Malonic acid, 2-amino-					
Asparagine, DL-					
Uridine					
Gluconic acid					
Norvaline					
Threonine, DL-					
[NA] 1403.6					
Pyroglutamic acid, DL-					
Threonic acid					
Lysine, DL-					
2-Desoxy-pentos-3-ylose					
Arabino-Hexonic acid					
Oxalic acid					
Proline, L-					
Adenine					
Octadecanoic acid, n-					
Alpha-aminopyrrolate					
Suberic acid					
Mannitol					
3,4-Dihydroxybutanoic acid					
Butyric acid, 4-amino-					
Sulfuric acid					
Galactosylglycerol					
Total	19	33	20	33	39

B.	<i>P. lautus</i>	<i>P. lautus</i> + <i>M. extorquens</i>	<i>M.</i> <i>extorquens</i>	<i>M.</i> <i>radiotolerans</i>	<i>P. lautus</i> + <i>M. radiotolerans</i>
Valine					
Malic acid					
Phenylpyruvic acid					
Putrescine					
Xylofuranose, D-					
Cadaverine					
Fumaric acid					
Homoserine, DL-					
Proline, 4-hydroxy-, DL-					
Pentanoic acid, 2-(methoxyimino)-3-methyl-					
[NA]_1055.7					
Ethanolamine					
Glyceric acid, DL-					
[NA]_1357.4					
Thymine					
Butyric acid, 4-amino-					
Proline, 4-hydroxy-, DL-					
Ketoglutaric acid					
Lysine, DL-					
Sedoheptulose					
Undecanedioic acid					
Hexadecanoic acid, n-					
Glucose-6-phosphate					
Maltose					
Cellobiose					
Phenylalanine, DL-					
Gluconic acid					
Glucopyranose					
Urea					
Gly-Pro dipeptide					
Benzoic acid					
Isoleucine, N-acetyl-, D-					
Arabinaric acid					
Total	25	12	3	3	13

Fig. S5. List of the substrates consumed (**A**) and metabolites produced (**B**) by *P. lautus*, *M. extorquens* and *M. radiotolerans* and/or cocultures. Presence of metabolites is represented by blue boxes. Metabolites belonging to the main families are listed with the following colors: amino acids (violet), organic acids and organic compounds (blue), sugars (orange) fatty acids (green) and amines (red)

PARTIE IV

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

IV. Conclusions et Perspectives

Problématique du sujet

Les systèmes d'eau industrielle peuvent être contaminés par des micro-organismes qui ont la capacité de résister à des procédés drastiques de décontamination et survivent ainsi dans un environnement extrêmement pauvre en nutriments. Cette survie peut être fortement facilitée par la formation de biofilms dans les circuits de traitement d'eau. Afin de détecter les micro-organismes résiduels de ces eaux industrielles et des produits finis, avant leur mise sur le marché, les industries pharmaceutiques, cosmétiques utilisent des systèmes de détection de contaminants dont le principe repose sur la croissance des micro-organismes comme cela est préconisé par les différentes Pharmacopées. Actuellement, les milieux de culture utilisés pour la détection de ces micro-organismes sont des milieux de culture complexes. Ces milieux, recommandés par les instances réglementaires, ont le désavantage d'être composés de matières premières d'origine animale ou végétale. De ce fait, la composition de ces milieux de culture n'est pas clairement définie, varie d'un lot à l'autre, et ne garantit pas la reproductibilité de leurs performances. Autre désavantage, ces milieux sont le plus souvent des milieux riches en nutriments et ne permettent pas la croissance optimale de bactéries à développement lent, souvent retrouvées dans les eaux industrielles. Par conséquent, la Pharmacopée recommande des durées d'incubation des milieux de culture pouvant aller jusqu'à 14 jours dans le cas du test de stérilité. Ce temps d'incubation permet de garantir qu'aucun micro-organisme n'est présent dans l'échantillon testé. Ces délais d'attente sont longs et coûteux pour les industries. Aussi, la demande de nouveaux milieux de culture permettant la croissance rapide des contaminants microbiens s'intensifie.

Pour répondre à cette demande, l'objectif principal de la thèse était d'élaborer une combinaison de deux milieux de culture synthétiques, l'un aérobie (MSaé) et l'autre anaérobie (MSana), permettant la croissance du plus grand nombre de micro-organismes et favorisant la croissance des bactéries à développement lent. Les milieux de culture synthétiques ont une composition dont la concentration de chaque élément est exactement définie. L'intérêt de tels milieux dans le domaine industriel est de garantir leur composition précise afin de permettre la reproductibilité de leurs performances, facilitant ainsi la validation de leur

utilisation pour des tests de détection microbiologiques. Toutefois, les milieux synthétiques existant ne permettent la croissance que de familles ou groupes de micro-organismes spécifiques ayant des besoins nutritifs relativement comparables. Jusqu'à présent, il n'existe pas de milieux synthétiques permettant la croissance d'une large gamme de micro-organismes. Ainsi, la mise au point d'un milieu synthétique de type « universel » représente un défi réel.

Une liste de micro-organismes, recommandés par les pharmacopées européenne, américaine et japonaise, ainsi que des micro-organismes fréquemment isolés dans les systèmes d'eau ultra pure industrielle (Ultra Pure Water) a été définie. Ces micro-organismes permettront d'évaluer les performances des milieux de culture synthétiques développés, MSaé et MSana. Par ailleurs, les milieux de culture TSB (aérobie) et FTM (anaérobie) requis par les normes dans les tests de contrôle de stérilité seront nos milieux de culture complexes de référence.

Par ailleurs, les mécanismes de survie des bactéries isolées des systèmes d'eau ultra pure sont encore largement méconnus : Quels sont les processus et interactions mis en place par ces micro-organismes leur permettant de résister aux stress subis ? Leur identification et leur compréhension devrait permettre d'apporter des réponses à cette question et améliorer la croissance de ces bactéries dans les milieux de culture synthétiques développés. La formation de biofilms est l'un des mécanismes importants de cette résistance aux stress, et la littérature abonde d'études centrées sur le développement de leur structure et de leur architecture, en contexte mono-espèce. Ainsi, nous avons choisi de travailler en biofilms multi-espèces, plus représentatifs de la réalité de nos environnements et permettant l'étude des interactions entre espèces.

Conclusions

La stratégie utilisée pour l'élaboration des milieux de culture synthétiques a consisté à étudier de manière séparée les différentes familles composant l'ensemble des facteurs nécessaires à la croissance cellulaire : les acides aminés, les bases azotées, les vitamines, les oligo-éléments, les sources de carbone ainsi que les macronutriments. De cette manière, les milieux étaient modifiés en continu permettant l'amélioration des performances ce qui a

souligné les avantages des milieux de culture synthétiques par rapport à un milieu complexe, c'est à dire optimiser la concentration et la forme chimique de chaque composant apporté. Ainsi, les fluctuations de performance observées dans un milieu de culture complexe, dues aux variations inter-lots de sa composition sont supprimées. Les milieux de culture synthétiques développés lors de ce travail fournissent, et fourniront toujours, des résultats fiables et répétitifs.

Les concentrations des éléments de nos milieux de culture synthétiques ont ainsi été affinées par ce processus d'amélioration continue de performance. La concentration en fer des milieux de culture synthétiques a prouvé avoir un effet considérable sur la performance des milieux, c'est à dire sur la croissance des bactéries sélectionnées. Dans le milieu MSaé, l'augmentation de sa concentration d'un facteur 10, par rapport à celle du milieu TSB, a permis une croissance plus rapide de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. L'importance de la concentration de chaque acide aminé a également été démontrée chez *Clostridium sporogenes* où seuls des ratios d'acides aminés précis permettent sa croissance.

Les micro-organismes ayant des exigences nutritionnelles très différentes seront difficilement mis en culture sur un milieu de culture complexe. En revanche, un milieu de culture synthétique idéalement formulé pourra apporter tous les éléments nécessaires à leur croissance. Ainsi, nous nous sommes appuyés sur les cartographies existantes des voies métaboliques de bactéries exigeantes et à développement lent (*Methylobacterium* sp.), ou sur l'exploration des données de séquençage existantes (site du génoscope), afin d'optimiser la formulation de nos milieux. Ces approches peuvent toutefois rester empiriques car les données de séquençage identifient bien souvent des gènes putatifs. Cependant, nous avons mis en œuvre ces approches dans les tests des différentes sources de carbone et des précurseurs métaboliques. Il a été ainsi possible de préciser que le pyruvate était la source de carbone la plus efficace pour la croissance de *M. extorquens* dans le milieu MSaé. La complémentation en vitamines du même milieu de culture synthétique, suite à l'étude des besoins vitaminiques de *S. epidermidis* a permis la croissance de la bactérie.

L'environnement ou la niche écologique de ces bactéries peut également renseigner sur les exigences nutritionnelles : seul l'ajout d'hémine (constituant du sang) dans le milieu MSana a permis la croissance de *B. vulgatus*, cultivé habituellement en milieux de culture complexes complémentés de sang de mouton. De même, seul l'addition d'acide oléique, acide

gras de l'épiderme des animaux sur lequel se développe *S. epidermidis*, a permis sa croissance dans le milieu Msaé le plus pauvre en nutriments.

La complémentation par les nutriments ou les molécules nécessaires à la croissance n'est pas la seule condition requise pour permettre la croissance d'une large gamme de bactéries dans un milieu de culture synthétique. Les paramètres physico-chimiques ont également une importance capitale. En effet, seule la diminution de la pression osmotique du milieu MSAé a permis la croissance de bactéries à développement lent telles *Ralstonia pickettii* et *M. extorquens* habituellement cultivées dans des milieux pauvres en nutriments. Des concentrations d'acides aminés et de sels proches des concentrations retrouvées dans le TSB ne permettaient pas la croissance de ces deux bactéries, la pression osmotique résultante étant trop forte. La forte diminution de la concentration des acides aminés (1/5) et des sels (1/3) permis leur développement dans le milieu de culture synthétique. En outre, l'ajout additionnel d'un osmo-protectant dans le milieu contribue à améliorer sensiblement la croissance de *M. extorquens*. De ce fait, les bactéries à développement lent se développent à présent plus rapidement que dans le milieu TSB. Étonnamment, les bactéries nécessitant de fortes concentrations en nutriments se développent avec un léger retard comparé à leur développement en milieu TSB. Cependant, c'est un avantage certain pour les systèmes de détection utilisés en industries, car même si la croissance de bactéries à développement rapide est légèrement ralentie, le gain de temps obtenu sur la croissance des bactéries à développement lent autorise une détection plus rapide de l'ensemble des bactéries.

A l'issue de cette première partie du travail de thèse, nous avons formulé nos milieux de culture synthétique (Msaé et Msana) qui permettent la croissance de l'ensemble des micro-organismes de la liste définie, excepté *Propionibacterium acnes* qui ne se développe toujours pas dans le milieu MSana. On peut ainsi conclure que l'objectif est en grande partie atteint car le MSAé est le premier milieu de culture synthétique permettant la croissance de micro-organismes phylogénétiquement très divers. De plus, les bactéries à développement lent se cultivent plus rapidement dans le Msaé que dans le milieu de culture complexe TSB, milieu de référence utilisé dans le test de stérilité. Ce nouveau milieu de culture synthétique offre ainsi une perspective prometteuse pour les industries.

Cependant, des améliorations doivent encore être apportées à ces milieux de culture synthétiques avant qu'ils puissent être utilisés dans les tests de détection de micro-organismes : En particulier permettre la croissance de *P. acnes*.

Dans la première partie de la thèse, nous avons donc réussi à formuler de nouveaux milieux de culture synthétiques permettant la croissance accélérée des bactéries isolées des systèmes de distribution d'eau ultra pure (UPW) de milieux industriels. Comment et par quels mécanismes de résistance ces bactéries peuvent-elles survivre dans ces milieux oligotrophes ? Ce sont les questions que nous avons abordées dans une seconde partie.

Les études de biofilms sont généralement réalisées en mono-espèce et très peu d'informations sont connues sur les biofilms multi-espèces, qui sont pourtant plus représentatifs de ce qui existe dans la nature. De ce fait, nous avons décidé d'étudier les biofilms multi-espèces et de nous focaliser sur les interactions entre les bactéries. Nous avons montré que la quantité de biofilm formé dépendait des espèces bactériennes associées. Ainsi, la présence de *P. lautus* augmente de façon sensible la production de biofilm, en particulier lorsqu'il est associé à *M. extorquens*, *M. radiotolerans* ou *M. aminovorans*. En revanche, *M. fujisawaense* ne permet pas cette augmentation démontrant qu'il ne s'agit pas d'un trait phylogénétique commun. Ces mécanismes de synergie sont confirmés par le fait que *M. extorquens* et *M. radiotolerans* déclenchent et augmentent le déplacement sur milieu solide (swarming ou essaimage) de *P. lautus* dans leur direction. Dans un second temps, *M. radiotolerans* et *M. extorquens* vont être transportés par les volutes d'essaimage de *P. lautus*. L'analyse des métabolites produits par les différentes espèces n'ont pour l'instant pas permis d'identifier les molécules responsables de ces interactions. Cependant, ces expériences tendent à démontrer que les processus de coopération, de mutualisme au sein de communautés bactériennes sont encore largement ignorés et méconnus. Nos résultats indiquent que la survie des bactéries isolées des UPW est rendue possible par coopération (adaptation) de la communauté ou de certains de ses membres, et non pas seulement par l'adaptation de l'espèce. Les comportements « sociaux » que nous connaissons en écologie des macro-organismes semblent tout aussi présents chez les bactéries.

Perspectives

A court et moyen terme, il s'agira avant tout de poursuivre l'amélioration des milieux de culture synthétiques de manière à ce que *P. acnes* puisse s'y développer. Pour ce faire, l'étude approfondie du métabolisme de cette bactérie sera nécessaire. Son génome étant entièrement séquencé, l'exploration de celui-ci permettra sans doute d'identifier des molécules candidates à ajouter à nos milieux et/ou d'identifier celles inhibant sa croissance. L'étude de son environnement naturel peut également fournir d'autres pistes dans la recherche de ces composés : par exemple, les différents acides gras pouvant se retrouver dans le sébum sécrété à la surface de l'épiderme humain par les follicules pileux, niche écologique de la bactérie. La préparation des milieux de culture synthétiques a montré que les méthodes utilisées pour dissoudre les molécules peuvent modifier leur structure, illustrant l'importance de cette étape. On peut penser modifier les molécules (acide oléique par exemple) de manière à les rendre plus solubles dans l'eau sans avoir à les ajouter sous forme de sels : c'est une piste que les chimistes empruntent dans d'autres contextes mais qui trouverait ici une application. De telles molécules simplifieraient la préparation de nos milieux de culture synthétiques (Msaé, Msana) qui contiennent de nombreuses molécules à dissoudre. La vérification de la stabilité dans le temps des milieux de culture synthétiques sera également à réaliser. En effet, le milieu Msaé, qui contient plus d'une cinquantaine de composés, pourrait ne pas pouvoir assurer des performances constantes dans le temps : dénaturation, dégradation, interactions des composés entre eux peuvent contribuer à modifier le milieu.

Ces travaux ont également pu mettre en évidence les limites de la détection visuelle ou de la prise de DO manuelle qui ne semble pas être la méthode la plus appropriée pour évaluer la croissance de nos bactéries, lorsque des centaines de combinaisons de milieux différents doivent être réalisées. Des méthodes de criblage haut débit comme celles utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour l'identification de molécules thérapeutiques peut représenter une solution intéressante (Hertzberg *et al*, 2000 ; Persidis, 1998). Une multitude de concentrations d'une ou plusieurs molécules pourraient ainsi être testées de manière automatisée. L'avancée des méthodes microfluidiques semblent aussi être prometteuse. En

effet, ce genre de système permet d'analyser en continu une multitude de microgouttelettes dans des conditions identiques ; chaque microgouttelette pourrait être un milieu de culture synthétique différent (Baraban *et al.*, 2011). L'analyse de la croissance des micro-organismes dans chaque microgouttelette permettrait d'identifier les milieux les plus performants.

Ainsi, à terme, ces travaux devraient permettre d'élaborer des milieux de culture synthétiques qui garantissent une reproductibilité, une performance et une croissance plus rapide des bactéries dont la croissance lente impose jusqu'ici des délais représentant un coût considérable pour les industries. Cela justifierait le processus de validation d'un nouveau milieu de culture synthétique ainsi que le coût potentiellement plus élevé comparé au milieu de culture complexe. Cependant, l'industriel pourrait largement compenser ce coût suite à une mise en vente plus rapide des produits finis.

Les perspectives des résultats obtenus en biofilms multi-espèces sont également nombreuses. En premier lieu, le travail se poursuivra par l'identification (« exhaustive ») de tous les métabolites produits par les micro-organismes, afin de pouvoir identifier les molécules signaux responsables de la communication entre les espèces bactériennes et de la mise en place de leurs comportements sociaux. Evidemment, on comprend aisément que ces molécules signaux pourraient aussi trouver leur utilité dans la formulation de milieux synthétiques. Ces identifications représentent un travail important dont les chances de succès demeurent inconnues, les premières tentatives étant demeurées infructueuses. En revanche, nous pourrions poursuivre nos collaborations afin d'étudier les interactions entre les différentes espèces bactériennes, en couplant les techniques classiques de microbiologie aux récentes méthodes -omiques basées sur les techniques de séquençage de nouvelle génération à très haut débit. Par exemple, nous pourrions étudier le transcriptome de nos bactéries dans les différentes conditions d'associations et de contact. L'expression différentielle des gènes que nous pourrions mettre ainsi en évidence nous proposera des pistes pour explorer ces mécanismes d'interactions et les qualifier. Il serait également intéressant de pouvoir utiliser une méthode de reconstruction 3D de l'environnement microbien (croissance des deux bactéries sur milieu gélosé suivi par l'analyse des coupes de la

gélose par spectromètre de masse MALDI-TOF) afin de visualiser les échanges métaboliques (Watrous *et al.* 2013) lors des interactions entre *P. lautus* et *M. extorquens* ou *M. aminovorans*.

L'ensemble des connaissances nouvelles acquises sur ces interactions multi-espèces pourra être mis à profit : la compréhension des mécanismes de résistance des communautés bactériennes permettrait sans doute de lutter contre les biofilms indésirables formés par les bactéries isolées dans les UPW, mais aussi ceux formés par les bactéries d'intérêt médical. Ne manquons pas de souligner également que malgré le séquençage de quelques bactéries du genre *Methylobacterium* ces dernières années, la compréhension du métabolisme des bactéries méthylophiles reste limitée. Il est raisonnable de penser que les interactions spécifiques entre *P. lautus* et *M. extorquens* ou *M. aminovorans* contribueront à une meilleure compréhension de la versatilité génomique et métabolique de ce genre.

Ainsi, ces trois années de travail de thèse apportent de très nombreux résultats qui intéressent à la fois l'industrie et la recherche appliquée mais également la recherche fondamentale. La complémentarité des approches mises en œuvre, des schémas de réflexion, de pensées des uns et des autres ont contribué à la réussite de ce travail. Nous aurions évidemment souhaité pouvoir donner la formulation définitive des milieux de culture synthétiques, mais cependant, les résultats « inattendus » et novateurs obtenus sur les biofilms des souches isolées d'UPW ouvrent de belles perspectives à ce travail.

PARTIE V

ANNEXES

V. Annexes

I. Annexe 1 :

Premier milieu synthétique anaérobie (quantité pour un litre)

Acides aminés :

Kit d'acides aminés (Sigma).....325 µg par acide aminé

Bases azotées :

Adénine.....10 mg

Guanine.....10 mg

Uracile.....10 mg

Thymine.....10 mg

Cystéine.....1 mg

Oligo-éléments :

Fer.....5 µg

Cobalt.....5 µg

Manganèse.....5 µg

Zinc.....5 µg

Cuivre.....5 µg

Nickel.....5 µg

Molybdène5 µg

Vitamines :

Acide α Lipoïque.....1 mg

Acide D-phantothanique.....1 mg

Acide 4-Aminobenzoïque.....1 mg

Acide folique.....1 mg

Biotine.....1 mg

Nicotinamide.....1 mg

Pyradoxine hydrochloride.....1 mg

Pyridoxal hydrochloride.....1 mg

Pyridoxamine dihydrochloride.....1 mg

Riboflavine.....1 mg

Thiamine hydrochloride.....1 mg

Autres :

Sodium chloride.....2.5 g

Dipotassium phosphate.....1 g

Dextrose5.5 g

KH_2PO_41 g

NH_4Cl1 g

MgSO_4100 mg

CaCl_220 mg

L-cystine hydrochloride.....0,5 g

Sodium Thioglycollate.....0,5 g

Résazurine.....1 mg

II. Annexe 2

Echantillons	Fer (238,204)	Cobalt (238,892)	Zinc (206,200)	Manganèse (257,610)	Molybdène (202,032)	Cuivre (327,395)	Nickel (231,604)
Longueur d'onde							
1) TSB	443,176	12,0028	1177,73	22,0855	17,9862	17,1598	12,747
2) FTM	318,639	7,27944	977,148	15,5578	1,73317	4,82524	1,11703
3) MSaé métaux liquides	1,84872	3,01402	4,58186	5,15302	0	4,58976	2,51478
4) MSana métaux liquides	8,989	3,53266	3,72213	14,0378	0,44802	3,89964	2,19764
5) MSaé Ø métaux	0,776172	0	1,13308	0	0	1,0847	0
6) MSana Ø métaux	9,37602	0	0,537173	16,2861	0	1,15279	0
7) MSaé métaux poudre	362,049	8,54129	926,596	29,4777	2,78965	5,25597	6,48131
8) MSana métaux poudre	12,9169	22,5525	3,25471	10,2791	3,06812	4,25059	0
9) R2B	89,3097	1,26999	84,2433	2,59568	0,567065	1,12726	2,79939
10) Extrait de levure	866,334	69,0322	1620,49	33,5723	0,062745	9,50768	1,63063
11) Caséine	1057,23	0,183776	367,882	32,1948	3,49012	3,40435	99,4056
12) Proteose peptone	1051,81	12,0838	854,566	23,2994	1,76891	21,373	4,23335
13) Peptone de soja	761,779	4,54945	525,031	61,5685	56,3437	7,2347	17,2299
14) Sodium chloride	0	0	0	0	0	2,2153	0
15) Dipotassium phosphate	6,16683	0	0,324677	0	0	0	0
16) KH ₂ PO ₄	0	0	0	0	0	0	0
17) NH ₄ Cl	3,29886	0	2,38739	0	0,335873	0,673463	0
18) MgSO ₄	1,23778	0	1,44322	0,740505	0	0	25,5585
19) CaCl ₂	0	0	0	0	0,207605	0,759627	0
20) H ₂ O milliQ	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 2 : Résultats de la première analyse par ICP-AES. Les résultats sont affichés en µg/L.

III. Annexe 3

Echantillons	Fer (238,204)	Cobalt (238,892)	Zinc (206,200)	Manganèse (257,610)	Molybdène (202,032)	Cuivre (327,395)	Nickel (231,604)
Longueur d'onde							
1) TSB	391,751	8,1127	1191,546	14,581	21,432	14,56	8,965
2) FTM	291,363	3,681	998,732	7,928	3,362	1,78	0
3) MSaé métaux liquides	0	0	0	0	0,941	19,652	0
4) MSana métaux liquides	4,35	0,617	3,151	5,633	0,504	0	0
5) MSaé Ø métaux	0	0	0	0	0,475	0	0
6) MSana Ø métaux	6,388	0	0	7,836	0	0	0
7) MSaé métaux poudre	0	0	0	0	0	1,477	17,03
8) MSana métaux poudre	10,467	19,09	3,506	2,09	0	0	0
9) R2B	68,815	0	73,266	0	3,723	0	0
10) Extrait de levure	90,937	4,272	199,692	0	0	0	0
11) Caséine	113,739	0	40,13	0	0,169	0	8,44
12) Proteose peptone	99,681	0	111,233	0	0	0	0
13) Peptone de soja	0	0	0	0	0	0	0
14) Sodium chloride	0	0	0	0	0	0	0
15) Dipotassium phosphate	0	0	0	0	0	0	0
16) KH ₂ PO ₄	0	0	0	0	0	0	0
17) NH ₄ Cl	0	0	0	0	0	0	0
18) MgSO ₄	0	0	0	0	0	0	0
19) CaCl ₂	0	0	0	0	0	0	0
20) H ₂ O milliQ	0	0	0	0	0	0	0

Annexe 3 : Résultats de la deuxième analyse par ICP-AES. Les résultats sont affichés en µg/L.

IV. Annexe 4

	TSB	MSaé 90°C	MSaé aa NaOH	MSaé aa HCL	MSaé MgSO4 1g/L	FTM
Alanine	0,235647124	0,141431762	0,124793115	0,147811017	0,147412314	0,141925807
Arginine	0,238550989	2,027679074	1,78927321	2,06312551	2,211550716	0,385735678
Glycine	0,131565914	0,181247958	0,157655018	0,204790868	0,188373726	0,038591432
Histidine	0,054374035	0,084721286	0,067579457	0,099381388	0,10043402	0,060539977
Hydroxyproline	0	0,107657168	0,08615388	0,09776763	0,111596148	0
Isoleucine	0,176784625	0,065384121	0,062928095	0,070004331	0,069947479	0,126595272
Lysine	0,144053099	0,078905923	0,070329415	0,103398991	0,084638583	0,282434997
Leucine	0,456433472	0,165914442	0,159612399	0,146317074	0,197663649	0,442649132
Methionine	0,104901319	0,104901319	0,095133167	0,137820066	0,123064573	0,115239343
Proline	0,092137765	0,146465772	0,114901335	0,112994553	0,11425556	0,038438079
Phenylalanine	-	-	-	-	-	-
Serine	0,154028367	0,208924419	0,261156389	0,204632584	0,239425481	0,098373053
Thréonine	0,239067844	0,272853806	0,233130866	0,256773115	0,269148973	0,166490103
Valine	0,214349349	0,107787824	0,10617976	0,103832395	0,106486382	0,171319998
Aspartate	0,085269063	0,073948639	0,087895875	0,09553482	0,094297804	0,094297804
Glutamate	0,147688027	0,075781549	0,075223346	0,064848212	0,093802825	0,066289616
Tryptophan	0,107100833	0,114809095	0,162518434	0,110861504	0,127546421	0,14139637
Tyrosine	0,080618309	0,108269485	0,136828656	0,10074166	0,120108348	0,060498839

Annexe 4 : Résultats de l'analyse UPLC-MS AccQTag. Les résultats sont affichés en g/L. – signifie que l'acide aminé n'a pas été détecté. Les milieux MSaé contiennent les solutions d'acides aminés dissous soit par HCl, NaOH et bouillis à 90 °C. Un milieu MSaé contenant les d'acides aminés dissous par HCl et une concentration de MgSO₄ à 1g/L a également été testé.

V. Annexe 5

Teneurs en vitamines de quelques produits de base pour milieux nutritifs (en µg/g)									
Produit	Prod. n°	B ₁	B ₂	B ₆	B ₁₂	Biotine	Acide nicotique	Acide folique	Acide pantothénique (Ca)
Hydrolysats de caséine (hydrolyse acide) «exempt de vitamines»	2238	2,0	5,16	<1,0	11,8	0,12	15,5	<0,1	<0,6
Hydrolysats de caséine (hydrolyse acide)	2245	0,86	4,1	4,0	12,8	0,18	5,3	0,48	6,0
Hydrolysats de caséine (pancréatique) exempt d'antagonistes de sulfamides	2239	38,5	8,86	16,8	26,3	0,27	3,8	0,51	6,0
Extrait de viande	3979	2,0	10,32	7,4	98,7	0,24	102,0	0,50	18,0
Gélatine	4070	2,0	3,94	1,0	11,6	0,11	0,1	0,55	6,0
Extrait de levure	3753	72,4	49,3	28,8	32,1	1,6	1128,3	1,83	60,0
Extrait de foie (enzymatique)	5402	0,8	45,6	15,4	30,6	2,85	34,7	3,03	36,6
Poudre de foie	5347	0,78	52,6	7,8	84,6	2,5	312,2	3,69	60,0
Extrait de malt	5391	4,0	4,33	8,6	16,7	0,19	38,6	0,95	11,2
Bile de bœuf, desséchée	3756	2,0	3,74	2,6	22,6	1,05	113,5	0,1	15,0
Peptone de caséine (trypsique)	7213	2,0	3,76	3,2	34,5	0,18	8,7	0,47	6,0
Peptone de viande (pepsique)	7224	4,02	2,76	16,6	19,1	0,69	36,0	0,51	10,2
Peptone de viande (trypsique)	7214	27,0	11,95	11,32	86,8	0,59	121,0	1,34	15,0
Peptone de farine de soja (papainique)	7212	5,0	10,66	7,0	16,4	0,72	155,2	0,96	60,0
Protéose-peptone	7229	2,0	6,5	6,2	134,4	0,20	90,8	0,51	21,0
Tryptose	10213	2,0	3,35	4,1	100,0	0,18	44,2	0,50	26,2

Annexe 5 : Concentrations théoriques des vitamines appartenant à la classe B dans différents produits complexes (Manuel de microbiologie Merck)

VI. Annexe 6

Milieu synthétique pour *M.extorquens* sans source de carbone décrit dans la publication « High-cell-density production of poly- β -hydroxybutarate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB » (Bourque *et al.*, 1995).

Composition pour 1 litre de milieu :

(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5 g
KH ₂ PO ₄	1.305 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O.....	4.02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1.35 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	60 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	60 mg
MnSO ₄ .H ₂ O.....	14.7 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	7.8 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	2.4 mg
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	2.4 mg
CoCl ₂ .6h ₂ O.....	2.4 mg
H ₃ BO ₃	1.8 mg

VII. Annexe 7

Milieu synthétique pour *M.extorquens* sans source de carbone décrit dans la publication « Implementation of Microarrays for *Methylobacterium extorquens* AM1 » (Okubo *et al.*, 2007).

Composition pour 1 litre de milieu :

NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....	2.9 g
K ₂ HPO ₄	2.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,19 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O.....	12 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	4 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1.4 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	1 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	1 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O.....	0,22 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,32 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0,35 mg

VIII. Annexe 8

: Milieu synthétique pour *M.extorquens* sans source de carbone décrit dans la publication « Demonstration of the ethylmalomyl-CoA pathway by using 13C metabolomics » (Peyraud *et al.*, 2009).

Composition pour 1 litre de milieu :

NH ₄ CL.....	1,62 g
MgSO ₄	0,2 g
K ₂ HPO ₄	2,21 g
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....	1,25 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O.....	15 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	4,5 mg
CoCl ₂ .6h ₂ O.....	0,3 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	1 mg
H ₃ BO ₃	1 mg
CaCl ₂	2,5 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O:.....	0,4 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	3 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,3 mg

IX. Annexe 9

Table S1: Recipe for MP Medium

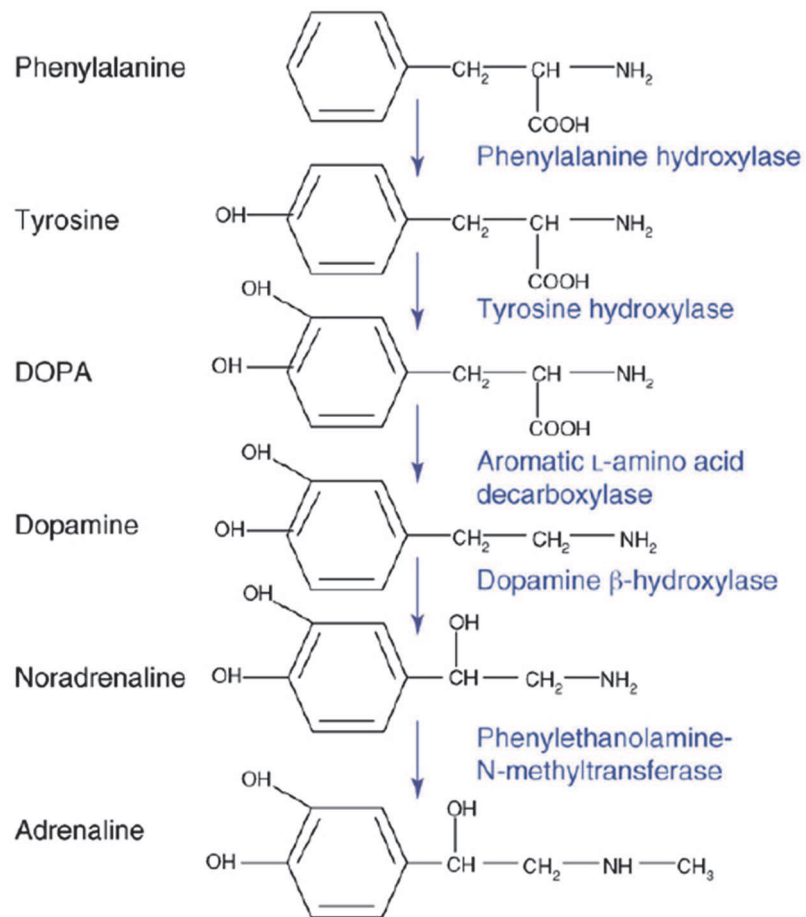
MP Media Recipe			FOR STOCK SOLUTIONS:		FOR 1 L MEDIA:	
		Molecular Weight (g)	CONCENTRATION	ADD TO 1 L dH ₂ O	FINAL CONCENTRATION	ADD
PIPES	C ₈ H ₈ N ₂ O ₆ S ₂	302.37	300 mM (10X)	90.711 g	30 mM	100 mL
P solution	K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	228.22	(100X) 145.0 mM	33.1 g	1.45 mM	10 mL
	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	137.99	187.69 mM	25.9 g	1.88 mM	
MgCl ₂	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	203.3	2 M (4000X)	406.6 g	0.5 mM	250 µL
(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	132.14	2 M (250X)	264.28 g	8 mM	4 mL
CaCl ₂	CaCl ₂ * 2 H ₂ O	147.02	2 M (100,000X)	294.04 g	20 µM	10 µL
C7-Metals MIX IN ORDER LISTED ↓	sodium citrate (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ * 2 H ₂ O)	294.1	(1000X) 45.53 mM	ADD TO 500 mL dH ₂ O 6705.5 mg	45.6 µM	1 mL
	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	287.54	1.2 mM	172.52 mg	1.2 µM	
	MnCl ₂ * 4 H ₂ O	197.9	1.0 mM	99 mg	1 µM	
	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	278.01	18 mM	2502 mg	18 µM	
	(NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	1235.86	2 mM	1235.6 mg	2 µM	
	CuSO ₄ * 5 H ₂ O	249.68	1 mM	124.8 mg	1 µM	
	CoCl ₂ * 6 H ₂ O	237.93	2 mM	237.9 mg	2 µM	
	Na ₂ WO ₄ * 2 H ₂ O	329.85	0.33 mM	54.4 mg	0.33 µM	
milliQ-H ₂ O						885 mL

Directions to prepare medium:

1. Make PIPES according to the preceding table and adjust to pH 6.75 by adding KOH.
2. Make additional stock solutions for P, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄. Autoclave all.
3. To make stock solution for C7 METALS, mix metals in order listed, dissolving sodium citrate first. Dissolve each metal before adding the subsequent one. Autoclave.
4. To make media, mix all components together except CaCl₂. Autoclave. Add CaCl₂. (CaCl₂ is added afterwards to avoid calcium phosphates from being formed in the autoclave).

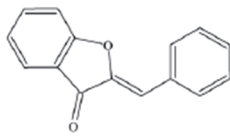
Annexe 9: Formulation du milieu MP Medium (Delaney *et al.*, 2013)

X. Annexe 10

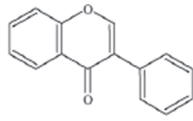
Catecholamine biosynthetic pathway

Annexe 10 : Voie de synthèse des catécholamines. Les catécholamines sont des molécules dérivées de la Tyrosine et composées d'un cycle benzénique comportant deux groupes hydroxyles adjacents opposés à une chaîne amine (Freestone *et al.*, 2008).

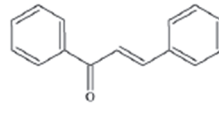
XI. Annexe 11



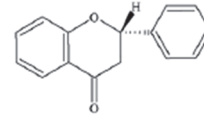
Aurone



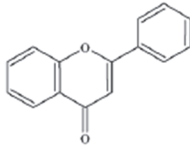
Isoflavone



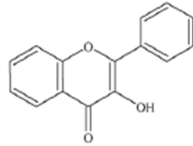
Chalcone



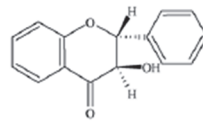
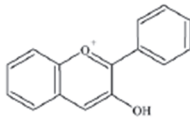
Flavanone



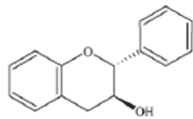
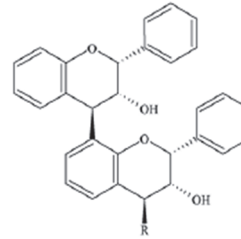
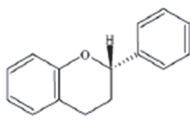
Flavone



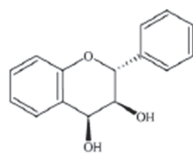
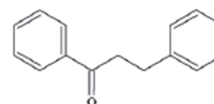
Flavonol

Flavanon-3-ol (also known as
3-hydroxyflavanone or dihydroflavonol)

Anthocyanidin

Flavan-3-ol (also known as
catechin)Proanthocyanidin (also known as flavolan
or condensed tannin)

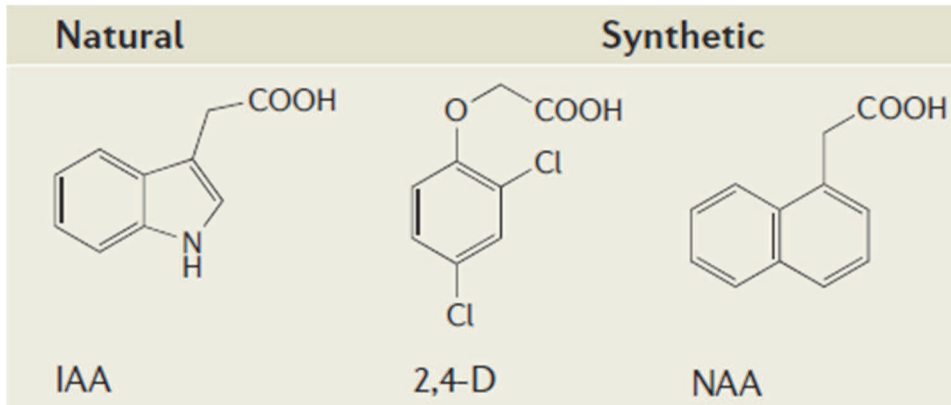
Flavan

Flavan-3,4-diol (also known as
leucoanthocyanidin)

Dihydrochalcone

Annexe 11 : Structure de base des différentes classes de flavonoïdes (Cushnie and Lamb, 2005).

XII. Annexe 12



Annexe 12 : Structure de trois auxines les plus couramment utilisées. IAA : acide indole 3-acétique, auxine naturelle la plus retrouvée dans le monde végétal ; 2,4-D : acide 2,4-dichlorophenoxy-acétique, herbicide ; NAA : acide 1-naphtalène acétique, auxine fréquemment utilisée dans l'horticulture (Teale *et al.*, 2006).

PARTIE VI

BIBLIOGRAPHIE

VI. Bibliographie

A

Achtman, M., and Wagner, M. (2008). Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature reviews Microbiology* 6, 431-440.

Akashi, H., and Gojobori, T. (2002). Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 3695-3700.

Anthony, C. (1982). *The Biochemistry of Methylophs*.

Azevedo, N.F., Braganca, S.M., Simoes, L.C., Cerqueira, L., Almeida, C., Keevil, C.W., and Vieira, M.J. (2012). Proposal for a method to estimate nutrient shock effects in bacteria. *BMC Res Notes* 5, 422.

B

Baraban, L., Bertholle, F., Salverda, M.L., Bremond, N., Panizza, P., Baudry, J., de Visser, J.A.G., and Bibette, J. (2011). Millifluidic droplet analyser for microbiology. *Lab on a Chip* 11, 4057-4062.

Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology* 22, 517-527.

Benoit, I., van den Esker, M.H., Patyshakuliyeva, A., Mattern, D.J., Blei, F., Zhou, M., Dijksterhuis, J., Brakhage, A.A., Kuipers, O.P., de Vries, R.P., *et al.* (2014). *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environmental microbiology*, n/a-n/a.

Bereschenko, L., Heilig, G., Nederlof, M., Van Loosdrecht, M., Stams, A., and Euverink, G. (2008). Molecular characterization of the bacterial communities in the different compartments of a full-scale reverse-osmosis water purification plant. *Applied and environmental microbiology* 74, 5297-5304.

Beumer, R.R., Te Giffel, M.C., Cox, L.J., Rombouts, F.M., and Abee, T. (1994). Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1359-1363.

Boch, J., Kempf, B., and Bremer, E. (1994). Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenously provided choline. *Journal of bacteriology* 176, 5364-5371.

Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., and Bremer, E. (1997). Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Archives of microbiology* 168, 282-289.

Bohus, V., Kéki, Z., Márialigeti, K., Baranyi, K., Patek, G., Schunk, J., and Tóth, E.M. (2011). Bacterial communities in an ultrapure water containing storage tank of a power plant. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica* 58, 371-382.

Bohus, V., Tóth, E.M., Székely, A.J., Makk, J., Baranyi, K., Patek, G., Schunk, J., and Márialigeti, K. (2010). Microbiological investigation of an industrial ultra pure supply water plant using cultivation-based and cultivation-independent methods. *Water Research* 44, 6124-6132.

Booth, I.R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological reviews* 49, 359.

Bourque, D., Pomerleau, Y., and Groleau, D. (1995). High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB. *Applied microbiology and biotechnology* 44, 367-376.

Brewer, D.G., Martin, S.E., and Ordal, Z.J. (1977). Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Applied and environmental microbiology* 34, 797-800.

Bruns, A., Cypionka, H., and Overmann, J. (2002). Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Applied and environmental microbiology* 68, 3978-3987.

C

Carroll, B.J., McNeil, D.L., and Gresshoff, P.M. (1985). A Supernodulation and Nitrate-Tolerant Symbiotic (nts) Soybean Mutant. *Plant physiology* 78, 34-40.

Chang, W.-S., van de Mortel, M., Nielsen, L., de Guzman, G.N., Li, X., and Halverson, L.J. (2007). Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of bacteriology* 189, 8290-8299.

Chistoserdova, L. (2011). Modularity of methylotrophy, revisited. *Environmental microbiology* 13, 2603-2622.

Chistoserdova, L., Chen, S.W., Lapidus, A., and Lidstrom, M.E. (2003). Methylotrophy in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J Bacteriol* 185, 2980-2987.

Chistoserdova, L., Kalyuzhnaya, M.G., and Lidstrom, M.E. (2009). The expanding world of methylotrophic metabolism. *Annu Rev Microbiol* 63, 477-499.

Clark, M.E., Edelmann, R.E., Duley, M.L., Wall, J.D., and Fields, M.W. (2007). Biofilm formation in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is dependent upon protein filaments. *Environmental microbiology* 9, 2844-2854.

Crowther, G.J., Kosály, G., and Lidstrom, M.E. (2008). Formate as the Main Branch Point for Methylotrophic Metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* 190, 5057-5062.

Csotonyi, J., Swiderski, J., Stackebrandt, E., and Yurkov, V. (2010). A New Extreme Environment for Aerobic Anoxygenic Phototrophs: Biological Soil Crusts. In *Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes*, P.C. Hallenbeck, ed. (Springer New York), pp. 3-14.

Cushnie, T., and Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 26, 343-356.

D

Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., and Lambrichts, I. (2006). Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *103*, 14965-14970.

Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews* *28*, 261-289.

Davey, M.E., and O'toole, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* *64*, 847-867.

Davis, B.D., and Mingioli, E.S. (1950). Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *Journal of Bacteriology* *60*, 17.

Dedysh, S.N., and Dunfield, P.F. (2011). Facultative and obligate methanotrophs how to identify and differentiate them. *Methods in enzymology* *495*, 31-44.

Delaney, N.F., Kaczmarek, M.E., Ward, L.M., Swanson, P.K., Lee, M.C., and Marx, C.J. (2013). Development of an optimized medium, strain and high-throughput culturing methods for *Methylobacterium extorquens*. *PloS one* *8*, e62957.

Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H., and Nyström, T. (2003). Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO reports* *4*, 400-404.

Downie, J.A. (2014). Legume nodulation. *Current biology* : CB *24*, R184-190.

Dumitru, R., Hornby, J.M., and Nickerson, K.W. (2004). Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* *48*, 2350-2354.

E

Elasri, M.O., and Miller, R.V. (1999). Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* *65*, 2025-2031.

Elias, S., and Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews* *36*, 990-1004.

Erb, T.J., Berg, I.A., Brecht, V., Muller, M., Fuchs, G., and Alber, B.E. (2007). Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 10631-10636.

Eshinimaev, B., Tsyrenzhapova, I.S., Khmelenina, V.N., and Trotsenko Iu, A. (2007). [Detection of osmoprotector ectoine content in methylotrophic bacteria using of normal-phase high performance liquid chromatography]. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologija* *43*, 215-218.

Eshoo, M.W. (1988). *lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *Journal of bacteriology* *170*, 5208-5215.

Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M., Schreiber, F., Dutilh, B.E., Zedelius, J., de Beer, D., *et al.* (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* *464*, 543-548.

F

Fabris, M., Matthijs, M., Rombauts, S., Vyverman, W., Goossens, A., and Baart, G.J.E. (2012). The metabolic blueprint of *Phaeodactylum tricornutum* reveals a eukaryotic Entner–Doudoroff glycolytic pathway. *The Plant Journal* *70*, 1004-1014.

Ferguson, D., and Cummins, C. (1978). Nutritional requirements of anaerobic coryneforms. *Journal of bacteriology* *135*, 858-867.

Ferrari, B.C., Winsley, T., Gillings, M., and Binnerup, S. (2008). Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. *Nat Protocols* *3*, 1261-1269.

Flemming, H., and Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part II: Technical aspects. *Water Science & Technology* *43*, 9-16.

Fraser, G.M., and Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology* *2*, 630-635.
 Freestone, P.P., Sandrini, S.M., Haigh, R.D., and Lyte, M. (2008). Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends in microbiology* *16*, 55-64.

Freestone, P.P., Walton, N.J., Haigh, R.D., and Lyte, M. (2007). Influence of dietary catechols on the growth of enteropathogenic bacteria. *International journal of food microbiology* *119*, 159-169.

Fritsche, W., and Laplace, F. (2002). *Mikrobiologie: mit 35 Tabellen* (Spektrum, Akad. Verlag).

Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* *176*, 269.

G

Gest, H. (1981). Evolution of the citric acid cycle and respiratory energy conversion in prokaryotes. *FEMS microbiology letters* *12*, 209-215.

Gest, H. (2004). The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes and records of the Royal Society of London* *58*, 187-201.

Greenstein, R.J., Su, L., and Brown, S.T. (2012). Vitamins A & D inhibit the growth of mycobacteria in radiometric culture. *PLoS one* *7*, e29631.

Gribbon, E., Cunliffe, W., and Holland, K. (1993). Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *Journal of general microbiology* *139*, 1745-1751.

H

Hagai, E., Dvora, R., Havkin-Blank, T., Zelinger, E., Porat, Z., Schulz, S., and Helman, Y. (2014). Surface-motility induction, attraction and hitchhiking between bacterial species promote dispersal on solid surfaces. *The ISME journal* *8*, 1147-1151.

Hahn, M.W., Stadler, P., Wu, Q.L., and Pöckl, M. (2004). The filtration–acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria. *Journal of microbiological methods* 57, 379-390.

Hanson, R.S., and Hanson, T.E. (1996). Methanotrophic bacteria. *Microbiological Reviews* 60, 439-471.

Harder, W., and Schleifer, K.-H.), pp. 618–634.

Hertzberg, Robert P., and Andrew J. Pope. "High-throughput screening: new technology for the 21st century." *Current opinion in chemical biology* 4.4 (2000): 445-451.

Hesse, W. (1992). Walther and Angelina Hesse-Early Contributors to Bacteriology. *ASM News* 58, 425-428.

Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., and O'Toole, G.A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular microbiology* 49, 905-918.

Holwerda, E.K., Hirst, K.D., and Lynd, L.R. (2012). A defined growth medium with very low background carbon for culturing *Clostridium thermocellum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 39, 943-947.

Horecker, B.L. (2002). The Pentose Phosphate Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 277, 47965-47971.

Hussain, M., Hastings, J., and White, P. (1991). A chemically defined medium for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Journal of medical microbiology* 34, 143-147.

I

Ingham, C.J., Kalisman, O., Finkelshtein, A., and Ben-Jacob, E. (2011). Mutually facilitated dispersal between the nonmotile fungus *Aspergillus fumigatus* and the swarming bacterium *Paenibacillus vortex*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19731-19736.

Ivanova, E., Doronina, N., and Trotsenko, Y.A. (2001). Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology* 70, 392-397.

J

Jaftha, J.B., Strijdom, B.W., and Steyn, P.L. (2002). Characterization of pigmented methylotrophic bacteria which nodulate *Lotononis bainesii*. *Systematic and applied microbiology* 25, 440-449.

Jebbar, M., Talibart, R., Gloux, K., Bernard, T., and Blanco, C. (1992). Osmoprotection of *Escherichia coli* by ectoine: uptake and accumulation characteristics. *Journal of bacteriology* 174, 5027-5035.

Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS microbiology letters* 236, 163-173.

Johnson, P.A., and Quayle, J.R. (1965). Microbial Growth on C1 Compounds. Synthesis of Cell Constituents by Methane- and Methanol-Grown *Pseudomonas Methanica*. *The Biochemical journal* *95*, 859-867.

Jourand, P., Renier, A., Rapior, S., de Faria, S.M., Prin, Y., Galiana, A., Giraud, E., and Dreyfus, B. (2005). Role of Methylophony During Symbiosis Between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* *18*, 1061-1068.

K

Kaeberlein, T., Lewis, K., and Epstein, S.S. (2002). Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* *296*, 1127-1129.

Karatan, E., and Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *73*, 310-347.

Kaserer, H. (1905). Über die Oxydation des Wasserstoffes und des Methans durch Mikroorganismen (Hartleben).

Kashket, E.R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS microbiology letters* *46*, 233-244.

Kawai, M., Yamagishi, J., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. (2004). Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of applied microbiology* *97*, 1123-1131.

Kemp, M.B., and Quayle, J.R. (1967). Microbial growth on C1 compounds. Uptake of [14C]formaldehyde and [14C]formate by methane-grown *Pseudomonas methanica* and determination of the hexose labelling pattern after brief incubation with [14C]methanol. *The Biochemical journal* *102*, 94-102.

Kempf, B., and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of microbiology* *170*, 319-330.

Khadem, A.F., Pol, A., Wieczorek, A., Mohammadi, S.S., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H.G., Jetten, M.S.M., and Op den Camp, H.J.M. (2011). Autotrophic Methanotrophy in *Verrucomicrobia*: *Methylacidiphilum fumariolicumSolV* Uses the Calvin-Benson-Bassham Cycle for Carbon Dioxide Fixation. *Journal of Bacteriology* *193*, 4438-4446.

Knief, C., Ramette, A., Frances, L., Alonso-Blanco, C., and Vorholt, J.A. (2010). Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. *The ISME journal* *4*, 719-728.

Knott, E.P., Assi, M., & Pearce, D.D. (2014). Cyclic AMP Signaling: A Molecular Determinant of Peripheral Nerve Regeneration. *BioMed Research International*, 2014, 651625. doi:10.1155/2014/651625

Koch, R. (1932). Die aetiologie der tuberkulose. *Journal of Molecular Medicine* *11*, 490-492.

Konovalova, H.M., Shylin, S.O., and Rokytko, P.V. (2007). [Characteristics of carotenoids of methylophony bacteria of *Methylobacterium* genus]. *Mikrobiologichnyi zhurnal* *69*, 35-41.

Krebs, H.A., and Johnson, W.A. (1937). Acetopyruvic acid (alpha-gamma-diketovaleric acid) as an intermediate metabolite in animal tissues. *The Biochemical journal* 31, 772-779.

Krebs, H.A., Salvin, E., and Johnson, W.A. (1938). The formation of citric and alpha-ketoglutaric acids in the mammalian body. *The Biochemical journal* 32, 113-117.

Kruger, N.J., and Von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organisation. *Current opinion in plant biology* 6, 236-246.

Kulakov, L.A., McAlister, M.B., Ogden, K.L., Larkin, M.J., and O'hanlon, J.F. (2002). Analysis of bacteria contaminating ultrapure water in industrial systems. *Applied and environmental microbiology* 68, 1548-1555.

L

Large, P.J., and Quayle, J.R. (1963). Microbial growth on C(1) compounds. 5. Enzyme activities in extracts of *Pseudomonas* AM1. *The Biochemical journal* 87, 386-396.

Lee, M.-C., Chou, H.-H., and Marx, C.J. (2009). ASYMMETRIC, BIMODAL TRADE-OFFS DURING ADAPTATION OF METHYLOBACTERIUM TO DISTINCT GROWTH SUBSTRATES. *Evolution* 63, 2816-2830.

Leisinger, T., and Braus-Stromeyer, S.A. (1995). Bacterial growth with chlorinated methanes. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 5, 33-36.

Leyral, G., and Vierling, E. (2007). *Microbiologie et toxicologie des aliments: hygiène et sécurité alimentaires* (Wolters Kluwer France).

Lidstrom, M.E. (2006). Aerobic methylotrophic procaryotes. In *The Prokaryotes*, Springer-Verlag, ed. (New York, NY, USA: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M.,

Lippert, K., and Galinski, E.A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Applied microbiology and biotechnology* 37, 61-65.

Losick, R., and Desplan, C. (2008). Stochasticity and cell fate. *Science* 320, 65-68.

M

Maamar, H., Raj, A., and Dubnau, D. (2007). Noise in Gene Expression Determines Cell Fate in *Bacillus subtilis*. *Science* 317, 526-529.

Madhaiyan, M., Kim, B.-Y., Poonguzhali, S., Kwon, S.-W., Song, M.-H., Ryu, J.-H., Go, S.-J., Koo, B.-S., and Sa, T.-M. (2007). *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57, 326-331.

Madigan, M.T. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*, 11th edn.

Mah, R.A., Fung, D.Y., and Morse, S.A. (1967). Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. *Applied microbiology* 15, 866-870.

Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., and Gerdes, K. (2013). (p) ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 154, 1140-1150.

Martin, D.D., Ciulla, R.A., and Roberts, M.F. (1999). Osmoadaptation in archaea. *Applied and environmental microbiology* 65, 1815-1825.

McLaggan, D., Naprstek, J., Buurman, E.T., and Epstein, W. (1994). Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 269, 1911-1917.

Measures, J.C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* 257, 398-400.

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T., and Cascante, M. (1996). The puzzle of the Krebs citric acid cycle: Assembling the pieces of chemically feasible reactions, and opportunism in the design of metabolic pathways during evolution. *J Mol Evol* 43, 293-303.

Michael, B., Smith, J.N., Swift, S., Heffron, F., and Ahmer, B.M. (2001). SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *Journal of bacteriology* 183, 5733-5742.

Miller, K.J., Zelt, S.C., and Bae, J.-H. (1991). Glycine betaine and proline are the principal compatible solutes of *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 23, 131-137.

Mitsui, R., Kusano, Y., Yurimoto, H., Sakai, Y., Kato, N., and Tanaka, M. (2003). Formaldehyde Fixation Contributes to Detoxification for Growth of a Nonmethylotroph, *Burkholderia cepacia* TM1, on Vanillic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 6128-6132.

Monds, R.D., and O'Toole, G.A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology* 17, 73-87.

Mukamolova, G.V., Turapov, O.A., Kazarian, K., Telkov, M., Kaprelyants, A.S., Kell, D.B., and Young, M. (2002). The *rpf* gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Mol Microbiol* 46, 611-621.

N

Nadell, C.D., Xavier, J.B., and Foster, K.R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews* 33, 206-224.

Nakagawa, T., Mitsui, R., Tani, A., Sasa, K., Tashiro, S., Iwama, T., Hayakawa, T., and Kawai, K. (2012). A catalytic role of XoxF1 as La³⁺-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. *PLoS one* 7, e50480.

Nisman, B. (1954). The stickland reaction. *Bacteriological reviews*, 18(1), 16.

O

O'Neil, M.J. (2013). *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (RSC Publishing).

Okubo, Y., Skovran, E., Guo, X., Sivam, D., and Lidstrom, M.E. (2007). Implementation of microarrays for *Methylobacterium extorquens* AM1. *Omics: a journal of integrative biology* *11*, 325-340.

Oliver, J.D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* *43*, 93-100.

Op den Camp, H.J.M., Islam, T., Stott, M.B., Harhangi, H.R., Hynes, A., Schouten, S., Jetten, M.S.M., Birkeland, N.-K., Pol, A., and Dunfield, P.F. (2009). Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia. *Environmental microbiology reports* *1*, 293-306.

P

Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences* *39*, 347-354.

Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology* *179*, 5756-5767.

Peekhaus, N., and Conway, T. (1998). What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *180*, 3495-3502.

Peel, D., and Quayle, J.R. (1961). Microbial growth on C1 compounds. I. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM 1. *The Biochemical journal* *81*, 465-469.

Persidis, A. (1998). High-throughput screening. *Nature biotechnology*, *16*(5), 488.

Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Massou, S., Portais, J.C., and Vorholt, J.A. (2009). Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using ¹³C metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 4846-4851.

Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Portais, J.C., and Vorholt, J.A. (2012). Co-consumption of methanol and succinate by *Methylobacterium extorquens* AM1. *PloS one* *7*, e48271.

Peyraud, R., Schneider, K., Kiefer, P., Massou, S., Vorholt, J.A., and Portais, J.C. (2011). Genome-scale reconstruction and system level investigation of the metabolic network of *Methylobacterium extorquens* AM1. *BMC Syst Biol* *5*, 189.

Pol, A., Barends, T.R., Dietl, A., Khadem, A.F., Eygensteyn, J., Jetten, M.S., and Op den Camp, H.J. (2014). Rare earth metals are essential for methanotrophic life in volcanic mudpots. *Environmental microbiology* *16*, 255-264.

Porter, J. (1976). Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriological reviews* *40*, 260.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A., Bacq-Calberg, C. M., Dusart, J., Microbiologie, De Boeck Université.

R

Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P., and Shinoda, S. (2014). Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Frontiers in public health* *2*.

Rasigraf, O., Kool, D.M., Jetten, M.S.M., Sinninghe Damsté, J.S., and Ettwig, K.F. (2014). Autotrophic Carbon Dioxide Fixation via the Calvin-Benson-Bassham Cycle by the Denitrifying Methanotroph "Candidatus Methyloirabilis oxyfera". *Applied and Environmental Microbiology* 80, 2451-2460.

Reasoner, D., and Geldreich, E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1-7.

Ren, D., Madsen, J.S., Sorensen, S.J., and Burmolle, M. (2014). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME journal*.

Riha, W.E., and Solberg, M. (1971). Chemically defined medium for the growth of *Clostridium perfringens*. *Applied microbiology* 22, 738-739.

Rodionov, D.A., Hebbeln, P., Eudes, A., Ter Beek, J., Rodionova, I.A., Erkens, G.B., Slotboom, D.J., Gelfand, M.S., Osterman, A.L., and Hanson, A.D. (2009). A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *Journal of bacteriology* 191, 42-51.

Roe, D., Finegold, S., Citron, D., Goldstein, E., Wexler, H., Rosenblatt, J., Cox, M., Jenkins, S., and Hecht, D. (2002). Multilaboratory comparison of growth characteristics for anaerobes, using 5 different agar media. *Clinical infectious diseases* 35, S36-S39.

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., *et al.* (2012). Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J Bacteriol* 194, 686-701.

S

Saito, Y., Fujii, R., Nakagawa, K.I., Kuramitsu, H., Okuda, K., and Ishihara, K. (2008). Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology* 23, 1-6.

Sakuragi, Y., and Kolter, R. (2007). Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 189, 5383-5386.

Schaechter, M., Ingraham, J.L., and Neidhardt, F.C. (2006). *Microbe* (ASM press Washington, DC).

Schauer, S., and Kutschera, U. (2008). Methylophilic bacteria on the surfaces of field-grown sunflower plants: a biogeographic perspective. *Theory in biosciences = Theorie in den Biowissenschaften* 127, 23-29.

Schneider, K., Peyraud, R., Kiefer, P., Christen, P., Delmotte, N., Massou, S., Portais, J.C., and Vorholt, J.A. (2012a). The ethylmalonyl-CoA pathway is used in place of the glyoxylate cycle by *Methylobacterium extorquens* AM1 during growth on acetate. *The Journal of biological chemistry* 287, 757-766.

Schneider, K., Skovran, E., and Vorholt, J.A. (2012b). Oxalyl-Coenzyme A Reduction to Glyoxylate Is the Preferred Route of Oxalate Assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Journal of Bacteriology* 194, 3144-3155.

Shah, I.M., Laaberki, M.-H., Popham, D.L., and Dworkin, J. (2008). A eukaryotic-like Ser/Thr kinase signals bacteria to exit dormancy in response to peptidoglycan fragments. *Cell* *135*, 486-496.

Sigel, R.K.O., and Pyle, A.M. (2006). Alternative Roles for Metal Ions in Enzyme Catalysis and the Implications for Ribozyme Chemistry. *Chemical Reviews* *107*, 97-113.

Sleator, R., Shortall, C., and Hill, C. (2008). Metagenomics. *Letters in applied microbiology* *47*, 361-366.

Sleator, R.D., and Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS microbiology reviews* *26*, 49-71.

Smith, K., and Hunter, I.S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* *57*, 966-973.

Søgaard-Andersen, L., Overgaard, M., Lobedanz, S., Ellehauge, E., Jelsbak, L., and Rasmussen, A.A. (2003). Coupling gene expression and multicellular morphogenesis during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology* *48*, 1-8.

Solano, C., Echeverz, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current opinion in microbiology* *18*, 96-104.

Squeglia, F., Marchetti, R., Ruggiero, A., Lanzetta, R., Marasco, D., Dworkin, J., Petoukhov, M., Molinaro, A., Berisio, R., and Silipo, A. (2011). Chemical basis of peptidoglycan discrimination by PrkC, a key kinase involved in bacterial resuscitation from dormancy. *Journal of the American Chemical Society* *133*, 20676-20679.

Stewart, E.J. (2012). Growing Unculturable Bacteria. *Journal of Bacteriology* *194*, 4151-4160.

Stewart, P.S., and William Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* *358*, 135-138.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., and Costerton, J.W. (2002). BIOFILMS AS COMPLEX DIFFERENTIATED COMMUNITIES. *Annual Review of Microbiology* *56*, 187-209.

Sturgill, G., and Rather, P.N. (2004). Evidence that putrescine acts as an extracellular signal required for swarming in *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology* *51*, 437-446.

Subramanian, S., Stacey, G., and Yu, O. (2007). Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in plant science* *12*, 282-285.

Sy, A., Timmers, A.C.J., Knief, C., and Vorholt, J.A. (2005). Methylophilic Metabolism Is Advantageous for *Methylobacterium extorquens* during Colonization of *Medicago truncatula* under Competitive Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* *71*, 7245-7252.

T

Taylor, L.P., and Grotewold, E. (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Current opinion in plant biology* *8*, 317-323.

Teale, W.D., Paponov, I.A., and Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *7*, 847-859.

Timmis, K.N. (2010). Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.

Trevors, J.T., Elsas, J.D., and Bej, A.K. (2012). The Molecularly Crowded Cytoplasm of Bacterial Cells: Dividing Cells Contrasted with Viable but Non-culturable (VBNC) Bacterial Cells. *Current issues in molecular biology* 15, 1-6.

Trotsenko, Y.A., and Murrell, J.C. (2008). Metabolic aspects of anaerobic obligate methanotrophy. *Adv Appl Microbiol* 63, 183–229.

U

Ueda, A., and Wood, T.K. (2009). Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS pathogens* 5, e1000483.

Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., and Węgrzyn, G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia* 62, 132-135.

V

Van Dien, S.J., and Lidstrom, M.E. (2002). Stoichiometric model for evaluating the metabolic capabilities of the facultative methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1, with application to reconstruction of C(3) and C(4) metabolism. *Biotechnology and bioengineering* 78, 296-312.

Van Dien, S.J., Okubo, Y., Hough, M.T., Korotkova, N., Taitano, T., and Lidstrom, M.E. (2003). Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. *Microbiology* 149, 601-609.

Varel, V.H., and Bryant, M.P. (1974). Nutritional features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Applied microbiology* 28, 251-257.

Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaeer, J., Vermant, J., and Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology* 16, 496-506.

Vorholt, J. (2002). Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria. *Archives of microbiology* 178, 239-249.

Vorobev, A., Jagadevan, S., Jain, S., Anantharaman, K., Dick, G.J., Vuilleumier, S., and Semrau, J.D. (2014). How Do Facultative Methanotrophs Utilize Multi-Carbon Compounds for Growth? Genomic and Transcriptomic Analysis of *Methylocystis* Strain SB2 Grown on Methane and on Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*.

Vuilleumier, S., Chistoserdova, L., Lee, M.C., Bringel, F., Lajus, A., Zhou, Y., Gourion, B., Barbe, V., Chang, J., Cruveiller, S., *et al.* (2009). *Methylobacterium* genome sequences: a reference blueprint to investigate microbial metabolism of C1 compounds from natural and industrial sources. *PLoS one* 4, e5584.

W

Watrous, Jeramie D., et al. "Microbial metabolic exchange in 3D." *The ISME journal* 7.4 (2013): 770-780.

Weil, J.-H., and Bonnet, J. (2005). *Biochimie générale: Cours et exercices corrigés* (Masson).

Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578-6583.

Willey, J.M., Sherwood, L., and Woolverton, C.J. (2011). *Prescott's microbiology* (McGraw-Hill).

Wood, J.M. (2006). *Osmosensing by Bacteria*, Vol 2006.

Wood, J.M. (2011). Bacterial Osmoregulation: A Paradigm for the Study of Cellular Homeostasis. *Annual Review of Microbiology* 65, 215-238.

Y

Yergeau, E., Schoondermark-Stolk, S.A., Brodie, E.L., Dejean, S., DeSantis, T.Z., Goncalves, O., Piceno, Y.M., Andersen, G.L., and Kowalchuk, G.A. (2008). Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. *The ISME journal* 3, 340-351.

Lien internet :

Parmacopée européenne : <http://online.pheur.org/EN/entry.htm>

Étude de la survie de contaminants bactériens modèles d'origine industrielle, isolés d'environnements oligotrophes, et élaboration de milieux synthétiques permettant leur croissance

Résumé

La mise au point de milieux de culture permettant de mettre en évidence rapidement et de manière reproductible des micro-organismes exigeants représenterait une évolution significative dans le contrôle des produits et procédés industriels.

Deux milieux de culture synthétiques ont été élaborés pour répondre à ce besoin. Le développement des milieux de culture a été réalisé en combinant l'analyse de composés nutritionnels à l'étude de certains métabolismes bactériens. Les formulations des milieux de culture obtenues permettent ainsi la croissance de micro-organismes aux exigences nutritionnelles très variées comme ceux fréquemment isolés dans l'eau industrielle.

En parallèle, des expériences sur des biofilms multi-espèces, utilisant des bactéries isolées de systèmes d'eau industrielle, ont permis d'observer que la survie des bactéries en milieu pauvre en nutriments, est dépendante d'interactions coopératives, basées sur le « swarming » et le « hitchhiking ».

Mots-clefs : culture, milieux synthétiques, comportement social, biofilm multi-espèces

Abstract

The development of culture media to quickly and reproducibly detect fastidious microorganisms represents a significant change in the control of industrial products and processes.

Two synthetic culture media have been developed to reach specifications. The development was performed by combining the analysis of nutritional compounds to the study of specific bacterial metabolisms. The formulations of the resulting culture media allow the growth of microorganisms with different nutritional requirements as those frequently isolated in industrial water.

In parallel experiments on multi-species biofilms, using bacteria isolated from industrial water systems, it was observed that the survival of bacteria in nutrient-poor environments is dependent on cooperative interactions, based on "swarming" and "hitchhiking".

Keywords: culture, synthetic media, social behavior, multi-species biofilm