



**HAL**  
open science

# Potentiels des poly-hydroxyalcanoates (PHAs) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique

Caroline Jain-Beuguel

► **To cite this version:**

Caroline Jain-Beuguel. Potentiels des poly-hydroxyalcanoates (PHAs) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0095 . tel-02144051

**HAL Id: tel-02144051**

**<https://theses.hal.science/tel-02144051>**

Submitted on 29 May 2019

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : *Microbiologie*

Par

**Caroline JAIN-BEUGUEL**

**Potentiels des Poly-HydroxyAlcanoates (PHA) bactériens pour  
l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique.**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 14.12.18

Unités de recherche : Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E - UMR6197) Ifremer Brest  
Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE - UMR7182) CNRS Thiais

## Rapporteurs avant soutenance : Composition du Jury :

**Sophie MONGE-DARCOS**

Professeur  
Université de Montpellier (UM) / ICGM

**Manfred ZINN**

Professeur  
University of Applied Sciences Switzerland (HES-SO)

**Gwenaëlle LE BLAY**

Professeur (Président du Jury)  
Université de Bretagne Occidentale (UBO) / LEMAR

**Sophie MONGE-DARCOS**

Professeur (Rapporteur)  
Université de Montpellier (UM) / ICGM

**Manfred ZINN**

Professeur (Rapporteur)  
University of Applied Sciences Switzerland (HES-SO)

**Ruxandra GREF**

Directeur de Recherche (Examineur)  
Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay

**Christelle SIMON-COLIN**

Chargé de Recherche (Directeur de thèse)  
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes

**Valérie LANGLOIS**

Professeur (Co-directeur de thèse)  
Université de Paris Est Créteil (UPEC) / ICMPE

# REMERCIEMENTS

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à Madame Sophie MONGE-DARCOS, Professeur à l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, ainsi qu'à Monsieur Manfred ZINN, Professeur de la Haute Ecole Spécialisée de Suisse Occidentale, pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie également Madame Ruxandra GREF, Directeur de Recherche à l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay, et Madame Gwenaëlle LE BLAY, Professeur au Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin de l'Université de Bretagne Occidentale, pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Ce travail de thèse a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (**LM2E**) de Brest, ainsi qu'à l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (**ICMPE**) de Thiais. Aussi, je tiens à remercier Monsieur Mohamed JEBBAR et Monsieur Didier FLAMENT, directeurs du LM2E, ainsi que Monsieur Michel LATROCHE et Madame Valérie LANGLOIS, directeurs de l'ICMPE, pour m'avoir si bien accueilli au sein de leur établissement.

Je tiens particulièrement à remercier l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) et la Région Bretagne pour m'avoir octroyé une allocation de recherche doctorale.

Je souhaite également remercier les membres de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer et du Littoral (EDSML) pour m'avoir permis d'effectuer ces trois années universitaires.

Mes profonds remerciements vont à Madame Christelle SIMON-COLIN, Chargée de Recherche HDR, ma directrice de thèse au LM2E, qui a cru en moi il y a plus de quatre ans déjà, m'a offert cette magnifique opportunité de recherche multidisciplinaire et m'a tant appris. Merci encore pour nos discussions enrichissantes, ta confiance, tes qualités professionnelles et plus encore, humaines.

Au même titre, je souhaite sincèrement remercier Madame Valérie LANGLOIS, Professeur à l'Université Paris Est Créteil, ma directrice de thèse à l'ICMPE, pour avoir judicieusement orienté ce sujet de thèse vers des travaux aussi originaux que novateurs, et

surtout pour m'avoir permis d'appréhender les fondements de la chimie des polymères. Merci à vous pour votre bienveillance, pour les opportunités scientifiques et l'autonomie que vous m'avez offertes.

Par ailleurs, je remercie chaleureusement l'ensemble des membres du LM2E et de l'ICMPE, chercheurs, ingénieurs et techniciens, pour leur disponibilité tant que pour l'aide et les réponses qu'ils ont toujours su m'apporter. La vie de laboratoire est riche, rythmée, pas toujours simple, mais c'est par vos idées et initiatives que le LM2E et l'ICMPE sont des laboratoires précurseurs et novateurs, au sein desquels j'ai été fière de travailler. J'ai passé trois années formidables à vos côtés !

Aussi, je tiens plus particulièrement à remercier Monsieur Erwan ROUSSEL, Chargé de Recherche au LM2E, pour son implication dans les expériences et travaux menés en biologie moléculaire. Nos discussions sur le rôle écologique des organismes producteurs de PHA et l'évolution des écosystèmes marins profonds ont été une source d'inspiration.

D'autre part et avec toute ma reconnaissance, je remercie Madame Estelle RENARD, Professeur à l'Université Paris Est Créteil, pour le savoir, la rigueur et les méthodes que vous m'avez transmis en matière de chimie des polymères. Oui, c'est grâce à vous et votre patience si aujourd'hui j'arrive à appréhender la synthèse et la caractérisation physico-chimique des PHA !

Je tiens également à vivement remercier Madame Ruxandra GREF, Directrice de Recherche à l'ISMO, qui m'y a accueilli et permis de m'intéresser aux nanoparticules de type MOF, qui sans nul doute incarnent la future génération de thérapeutique. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, votre gentillesse et la confiance que vous m'avez portée. Je remercie avec la même sincérité tous les membres de votre équipe, impliqués et bienveillants, avec qui j'ai beaucoup apprécié échanger et travailler.

Par ailleurs, je remercie Madame Ludivine HOUEL-RENAULT, Ingénieure affiliée au Centre de Photonique BioMédicale à l'ISMO, pour m'avoir formé avec énergie et dévouement aux techniques complexes de la biologie cellulaire et de la microscopie confocale.

Bien évidemment, je remercie avec énormément d'amitié mes collègues doctorants, post-docs et jeunes stagiaires, qui ont été nombreux à mes côtés durant ces trois années. Le soutien, les discussions scientifiques (ou moins scientifiques...), les valeurs, les péripéties et les rires que nous avons partagés ont contribué à rendre cette grande aventure du doctorat la plus belle et enrichissante possible ! Je ne citerai pas de noms de peur de ne pas être exhaustive, néanmoins je tiens particulièrement à encourager mes paires, les copains qui s'appêtent également à soutenir leur thèse, à savoir Seb, Yang, Flo, Clarisse, Etienne, Antoine et Sarra. Merci, merci, et bonne continuation à vous tous !

Par ailleurs et s'agissant de soutien, de valeurs et de rires, je remercie mes amis, ceux de la première heure et ceux rencontrés trop tard, merci pour vos encouragements mais surtout, merci pour tous ces bons moments, ces moments qui font que la vie est belle, folle et excitante ! Ainsi et par ordre alphabétique, Merci Barbie, Carine, Charlou, Didine, Jé, Justyne, Lévé, Math, Mel, Papass, Pauline, Perrette, Seb, Steven et Yang.

Bien sûr, je tiens à remercier avec toute mon affection ma famille, pour vos encouragements et votre bienveillance, et avec tout mon amour, mes parents. Ca y est Papa, j'ai enfin fini mes études ! La rigueur, la loyauté et le travail sont les valeurs que tu m'as inculquées, et que je tâcherai de ne jamais oublier. Merci !

Enfin, et peut-être même avant tout, je remercie mon mari, Quentin BEUGUEL, sans qui je n'aurais probablement pas osé débiter une carrière dans la recherche. Brillant rhéologue, tu as toujours cru en moi, et n'as eu de cesse de m'encourager et de m'aider, avec tant de persévérance que de bienveillance. Tu es certainement mon meilleur collègue, mon meilleur partenaire, en sciences comme sur le long chemin de notre vie, Merci !



# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	16

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>18</b>
------------------------------------	-----------

## **CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES POLY(HYDROXYALCANOATES) .....**

I. 1. Présentation des Poly(HydroxyAlcanoates) .....	24
I. 1. 1. Découverte des PHA .....	24
I. 1. 2. Biosynthèse des PHA .....	26
I. 1. 3. Rôles écophysiologiques des PHA bactériens.....	32
I. 1. 4. Rôles des monomères de PHA chez l'Homme .....	33
I. 1. 5. Biosynthèse et potentiels des copolymères de P(3HB4HB) .....	35
I. 2. Méthodes de détection de bactéries productrices de PHA .....	37
I. 2. 1. Techniques de criblage non moléculaire .....	37
I. 2. 2. Techniques de criblage moléculaire.....	38
I. 3. Potentialités des PHA .....	41
I. 3. 1. Implantation des PHA sur le marché.....	43
I. 3. 2. Fonctionnalisation des PHA comme matériaux polyvalents .....	45
I. 3. 2. 1. Fonctionnalisation de PHA par biosynthèse.....	45
I. 3. 2. 2. Fonctionnalisation de PHA par modification chimique .....	47
I. 3. 2. 3. Fonctionnalisation de PHA par greffage de polymères biocompatibles .....	48
I. 3. 3. Usage des PHA à des fins biomédicales .....	50
I. 3. 3. 1. PHA, matériaux pour l'ingénierie tissulaire.....	51
I. 3. 3. 2. PHA, matériaux pour la libération contrôlée de principes actifs.....	53
I. 3. 4. MOF & nanoparticules hybrides.....	56
I. 4. Conclusion.....	59

## **CHAPITRE II EXPLORATION DE LA BIODIVERSITE ASSOCIEE AUX ENVIRONNEMENTS MARINS PROFONDS POUR LA DETECTION DE BACTERIES PRODUCTRICES DE P(3HB4HB).....**

II. 1. Introduction .....	64
---------------------------	----

II. 2. Matériels & Méthodes.....	67
II. 2. 1. Echantillonnage de la collection Ifremer-LM2E .....	67
II. 2. 2. Elaboration d'une collection de travail .....	69
II. 2. 3. Développement d'une méthode de criblage moléculaire pour la détection de bactéries productrices de P(3HB4HB).....	69
II. 2. 3. 1. Conception d'amorces PCR ciblant les gènes <i>phaC</i> et <i>4HBCoAt</i> .....	70
II. 2. 3. 2. Mise au point d'un protocole de criblage moléculaire des gènes <i>phaC</i> et <i>4HBCoAt</i> par technique PCR .....	74
II. 2. 4. Approche culturale pour la production de copolymères de P(3HB4HB) par fermentation bactérienne.....	76
II. 2. 4. 1. Production de P(3HB4HB) en erlenmeyers selon un protocole de culture standardisé .....	76
II. 2. 4. 2. Optimisation de la production de P(3HB4HB) en bioréacteurs .....	78
II. 2. 5. Extraction, purification et caractérisation des PHA .....	80
II. 2. 5. 1. Extraction et purification des PHA.....	80
II. 2. 5. 2. Caractérisation des PHA .....	80
II. 2. 6. Analyses phylogénétiques des souches productrices de PHA issues d'environnements marins profonds .....	81
II. 2. 7. Séquençage des produits PCR amplifiés par les couples d'amorces PHAsclf/r et 4HBf/r ..82	
II. 2. 7. 1. Purification des produits PCR amplifiés par les amorces PHAscl et 4HB à l'aide d'un kit commercial .....	83
II. 2. 7. 2. Purification des produits PCR PHAscl par clonage.....	84
II. 3. Résultats & Discussion.....	87
II. 3. 1. Détection par criblage moléculaire PCR des bactéries potentiellement productrices de P(3HB4HB).....	87
II. 3. 1. 1. Détection des gènes <i>16S</i> , <i>phaC</i> et <i>4HBCoAt</i> par criblage moléculaire .....	87
II. 3. 1. 2. Séquençage des produits PCR amplifiés par les amorces PHAsclf/r1 et 4HBf/r1.....	92
II. 3. 2. Production de copolymères de P(3HB4HB) par fermentation bactérienne à partir des souches révélées positives au criblage moléculaire.....	96
II. 3. 2. 1. Production de copolymères de P(3HB4HB) selon un protocole de culture standardisé .....	97
II. 3. 2. 2. Essai d'optimisation de la production de copolymères de P(3HB4HB) .....	106
II. 3. 3. Exploration de la biodiversité bactérienne productrice de PHAscl associée aux environnements marins profonds .....	109
II. 3. 3. 1. Analyse phylogénétique des souches bactériennes productrices de copolymères de P(3HB4HB).....	109
II. 3. 3. 2. Analyse phylogénétique des souches bactériennes productrices de PHAscl.....	111
II. 3. 3. 3. Analyse phylogénétique des souches bactériennes basée sur la détection du gène <i>phaC</i> ..116	

<b>CHAPITRE III SYSTEMES PARTICULAIRES POREUX HYBRIDES ORGANIQUES-INORGANIQUES BIOCOMPATIBLES .....</b>	<b>120</b>
III. 1. Introduction .....	122
III. 2. Matériels & Méthodes.....	123
III. 2. 1. Matériels.....	123
III. 2. 2. Synthèse de PHA amphiphiles.....	123
III. 2. 2. 1. Synthèse de $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-(20)$ .....	123
III. 2. 2. 2. Synthèse de $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ et de $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ .....	124
III. 2. 3. Conception de nanoparticules hybrides MOF-PHA.....	125
III. 2. 4. Caractérisations physico-chimique et microscopique des polymères synthétisés .....	126
III. 2. 5. Tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire sur une lignée cellulaire de type macrophages au contact de nanoparticules MOF-PHA .....	127
III. 2. 5. 1. Culture des cellules modèles J774.A1.....	127
III. 2. 5. 2. Tests de cytotoxicité .....	127
III. 2. 5. 3. Test de prolifération cellulaire.....	129
III. 2. 6. Observations par microscopie confocale à balayage laser .....	129
III. 3. Résultats & Discussion.....	131
III. 3. 1. Synthèse de PHA à moyennes chaînes hydrosolubles.....	131
III. 3. 1. 1. Greffage de groupements sulfonates .....	131
III. 3. 1. 2. Greffage de polymères de poly(éthylène glycol) .....	136
III. 3. 1. 3. Caractérisations physico-chimiques .....	138
III. 3. 2. Synthèse de nanoparticules hybrides MOF-PHA.....	140
III. 3. 2. 1. Caractérisations physico-chimiques .....	140
III. 3. 2. 2. Caractérisation par microscopie.....	145
III. 3. 3. Etude de la biocompatibilité des nanoparticules hybrides MOF-PHA .....	148
III. 3. 3. 1. Cytotoxicité des nanoparticules hybrides MOF-PHA vis-à-vis d'une lignée immunitaire phagocytaire .....	148
III. 3. 3. 2. Etude de la prolifération d'une lignée immunitaire phagocytaire au contact de nanoparticules hybrides MOF-PHA.....	154
III. 3. 4. Comportement d'une lignée immunitaire phagocytaire au contact de nanoparticules hybrides MOF-PHA.....	157
 <b>CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>160</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>168</b>
 <b>VALORISATION SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>196</b>



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 01.</b> Image de microscopie électronique de la souche bactérienne <i>Ferrobacillus ferrooxidans</i> en phase d'accumulation intracellulaire de P(3HB). Barre d'échelle = 500 nm. .24	24
<b>Figure 02.</b> Structure générale des poly(3-hydroxyalcanoates).....26	26
<b>Figure 03.</b> Voies de biosynthèse des poly(3-hydroxyalcanoates).....27	27
<b>Figure 04.</b> Organisation des opérons codant les PHA synthases de types I, II, III et IV. ....28	28
<b>Figure 05.</b> Schéma récapitulatif des interactions entre les protéines impliquées dans la synthèse des PHA. ....29	29
<b>Figure 06.</b> Voies métaboliques de biosynthèse des PHA. ....31	31
<b>Figure 07.</b> Structure chimique du 3-hydroxybutyrate et du 4-hydroxybutyrate.....34	34
<b>Figure 08.</b> Représentation du plasmide pKSE5.3 portant les gènes <i>phaC</i> et <i>4HBCoAt</i> chez la bactérie compétente <i>E. coli</i> XL1-blue.....36	36
<b>Figure 09.</b> Récapitulatif des étapes effectuées dans le cadre du criblage moléculaire par PCR. ....39	39
<b>Figure 10.</b> Positionnement des bioplastiques. ....41	41
<b>Figure 11.</b> Classification des bioplastiques issus de ressources renouvelables. ....42	42
<b>Figure 12.</b> Capacités de production mondiale des bioplastiques en 2017. ....43	43
<b>Figure 13.</b> Structure générale de PHA à courtes et moyennes chaînes.....45	45
<b>Figure 14.</b> Structures moléculaires de PHA fonctionnalisés obtenus par fermentation bactérienne ou par modifications chimiques. ....46	46
<b>Figure 15.</b> Schéma de la réaction de type thiol-ène. ....49	49
<b>Figure 16.</b> Exemples de biomatériaux conçus à base de PHA. ....52	52
<b>Figure 17.</b> Evolution de la concentration en molécules actives au niveau du site d'action ciblé.....54	54
<b>Figure 18.</b> Exemples de biomatériaux conçus à base de PHA. ....55	55
<b>Figure 19.</b> Schéma de la structure d'un MOF MIL-100(Fe). ....57	57
<b>Figure 20.</b> Schéma des structures marines retrouvées à proximité d'une plaque tectonique. ....64	64
<b>Figure 21.</b> Image d'une cheminée hydrothermale située au niveau de la ride Juan de Fuca dans l'océan Pacifique, et paramètres physico-chimiques associés.....65	65
<b>Figure 22.</b> Noms, dates et zones géographiques des campagnes océanographiques Ifremer. ....68	68
<b>Figure 23.</b> Alignement des régions conservées des séquences protéiques codant la PHA synthase de type I (PhaC) ( <i>numéros d'accension GenBank entre parenthèses</i> ). ....70	70
<b>Figure 24.</b> Alignement des régions conservées des séquences nucléotidiques relatives au gène <i>phaC</i> de type I ( <i>numéros d'accension GenBank entre parenthèses</i> ).....71	71
<b>Figure 25.</b> Alignement des régions conservées des séquences protéiques codant la 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transferase (4HBCoAt) ( <i>numéros d'accension GenBank entre parenthèses</i> ).....72	72
<b>Figure 26.</b> Alignement des régions conservées des séquences nucléotidiques du gène <i>4HBCoAt</i> ( <i>numéros d'accension entre parenthèses</i> ). ....73	73

<b>Figure 27.</b> Schéma du procédé de production de PHA en erlenmeyers en deux phases. ....	76
<b>Figure 28.</b> Composants d'un bioréacteur Minifors 5 L (INFORS). ....	78
<b>Figure 29.</b> Schéma du procédé de production de PHA en bioréacteurs en deux phases. ....	79
<b>Figure 30.</b> Carte génique et séquences promotrices du vecteur pGEM-T (Promega). ....	84
<b>Figure 31.</b> Gel d'électrophorèse des produits PCR des souches AT1214, AT1218 et AT1216, amplifiés par les amorces 16S, PHAsclf/r1.r2 et 4HBf/r1.r2. ....	88
<b>Figure 32.</b> Position et appartenance des nucléotides retrouvés en début de chaque fragment cloné et séquencé. ....	92
<b>Figure 33.</b> Alignement des séquences nucléotidiques des PHA synthases de type I, II, III et IV. ....	96
<b>Figure 34.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du P(3HB), produit par la souche AT1214 en présence de 5 g/L de glucose. ....	100
<b>Figure 35.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du copolymère de P(3HB4HB <sub>4%</sub> ) synthétisé par la souche AT1233, en présence de 5 g/L de glucose et 1,5 g/L de $\gamma$ -hydroxybutyrate (4M). ....	101
<b>Figure 36.</b> Position phylogénétique des souches bactériennes productrices de copolymères de P(3HB4HB), établie d'après les séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S. ...	110
<b>Figure 37.</b> Position phylogénétique des souches bactériennes productrices de PHA à courtes chaînes, établie d'après les séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S. ....	112
<b>Figure 38.</b> Position phylogénétique des souches bactériennes détectées positives pour le gène <i>phaC</i> , établie d'après les séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S. ....	118
<b>Figure 39.</b> Modifications chimiques du PHOU impliquant le greffage (1) de groupements sulfonates (SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) puis (2) de poly(éthylène glycol) par réaction thiol-ène photoactivée. ....	131
<b>Figure 40.</b> Spectres RMN <sup>1</sup> H du PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(33)</sub> (a) dans le CDCl <sub>3</sub> et du PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(13)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> (b) dans le DMSO-d <sub>6</sub> . ....	132
<b>Figure 41.</b> Conversions des insaturations latérales du PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(33)</sub> , en fonction des ratios molaires de SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , déterminées par RMN <sup>1</sup> H. ....	133
<b>Figure 42.</b> Spectres RMN <sup>1</sup> H du PEG méthyle éther thiol dans le CDCl <sub>3</sub> . ....	134
<b>Figure 43.</b> Spectres RMN <sup>1</sup> H du PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(7)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(6)</sub> (a) et du PHO <sub>(67)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(13)</sub> (b), dans le DMSO-d <sub>6</sub> . ....	135
<b>Figure 44.</b> Ratios de PEG déterminés par RMN <sup>1</sup> H à partir des copolymères PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(7)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(6)</sub> (gris) et PHO <sub>(67)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(13)</sub> (noir), en fonction du nombre de dialyses effectuées. ....	137
<b>Figure 45.</b> Thermogrammes du PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(33)</sub> , du PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(7)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(6)</sub> , du PHO <sub>(67)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(13)</sub> et du PEG. ....	139
<b>Figure 46.</b> Schéma récapitulatif de la conception de nanoparticules hybrides MOF-PHA par imprégnation. ....	140
<b>Figure 47.</b> Potentiel zêta des nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de copolymères de PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(7)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(6)</sub> et de PHO <sub>(67)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(13)</sub> , mesuré dans l'eau ultra pure. ....	141
<b>Figure 48.</b> Diamètres des nanoparticules hybrides MOF-PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(7)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(6)</sub> et MOF-PHO <sub>(67)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(13)</sub> mesurés pendant 96 h dans l'eau ultra pure (a et b) et 24 h dans du tampon phosphate salin (PBS) à 37°C (c et d), en fonction des concentrations en copolymères. ....	142
<b>Figure 49.</b> Clichés de TEM et proportions atomiques relevées par SEM et STEM-EDX à partir de nanoparticules de type MOF nus, enrobés de 4 g/L de PHO <sub>(67)</sub> U <sub>(7)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(6)</sub> ou de PHO <sub>(67)</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> <sub>(20)</sub> PEG <sub>(13)</sub> . ....	146

<b>Figure 50.</b> Mortalité des cellules J774.A1 calculée à partir du test CytoTox Fluor (Promega), en fonction des concentrations en copolymères (a) ou en nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés de PHA fonctionnalisés (b), après 24 h d'incubation.....	149
<b>Figure 51.</b> Viabilité des cellules J774.A1 calculée à partir du test LDH (Roche), en fonction des concentrations en copolymères (a) ou en nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés de PHA fonctionnalisés (b), après 24 h d'incubation. ....	151
<b>Figure 52.</b> Nombre de cellules J774.A1 viables déterminé par le test RealTime Glo pendant 42 h en présence de copolymères de PHA fonctionnalisés ou de nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés.....	155
<b>Figure 53.</b> Images de microscopie confocale d'un macrophage murin J774.A1 après 3 h d'incubation, sans traitement (a) et en présence de 100 µg/mL de nanoparticules de type MOF MIL-100.....	157
<b>Figure 54.</b> Images de microscopie confocale de macrophages murins J774.A1 après 3 h d'incubation au contact de 200 µg/mL de copolymères de $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ imprégnés de rhodamine b (a) ou de 100µg/mL de nanoparticules de type MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ (b).....	158



# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 01.</b> Propriétés thermiques et mécaniques des P(3HB), P(3HB3HV), P(3HB4HB), P(3HB3HHx) et P(3HO3HHx). .....	50
<b>Tableau 02.</b> Noms des campagnes océanographiques Ifremer, dates, localisations, profondeurs d'échantillonnage et nombre de souches mésophiles aérobies collectées.....	68
<b>Tableau 03.</b> Séquences nucléotidiques des amorces PHAsclf, PHAsclr1 et PHAsclr2. ....	72
<b>Tableau 04.</b> Séquences nucléotidiques des amorces 4HBf, 4HBr1 et 4HBr2.....	73
<b>Tableau 05.</b> Nombre de souches bactériennes possédant les gènes <i>phaC</i> , <i>4HBCoAt</i> , ou les deux, classés par campagne océanographique Ifremer.....	89
<b>Tableau 06.</b> Récapitulatif des 237 souches bactériennes possédant le gène <i>phaC</i> , le gène <i>4HBCoAt</i> , ou les deux. ....	90
<b>Tableau 07.</b> Noms des souches et affiliations taxonomiques, correspondances BlastN/BlastX des produits PCR séquencés et pourcentages de similarité.....	94
<b>Tableau 08.</b> Moyenne des rendements de PHA (en g/L et en g PHA/g masse cellules sèches), temps de fermentation (h), masses de cellules sèches (g/L) et compositions monomériques des PHA obtenus après fermentation cellulaire en présence de 5 g/L de glucose et 1,5 g/L de $\gamma$ -HB. ....	98
<b>Tableau 09.</b> Rendements et ratios de 4HB en fonction du mode de culture, de la durée de fermentation et des sources carbonées. <i>Glu</i> : <i>glucose</i> , <i>Gly</i> : <i>glycérol</i> , <i>1,4but</i> : <i>1,4-butanediol</i> . ....	107
<b>Tableau 10.</b> Numéros d'accèsion NCBI GenBank correspondant à l'ARNr 16S des souches porteuses du gène <i>phaC</i> . ....	119
<b>Tableau 11.</b> Ratio massique de PEG libres éliminés après dialyse, en fonction de la concentration du $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ dans le DMSO. ....	137
<b>Tableau 12.</b> Caractéristiques des polymères de PEG, $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$ , $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ et $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ . ....	138
<b>Tableau 13.</b> Compositions atomiques moyennes des nanoparticules de type MOF natifs ou imprégnés de 4 g/L de $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ ou de $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , déterminées par STEM-EDX et SEM-EDX, comparées à la composition élémentaire des MOF calculée par XPS. ....	147



# LISTE DES ABBREVIATIONS

4HBCoAt	4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transferase ( <i>4HBCoAt</i> : gène)
ARNr 16S	Acide ribonucléique ribosomique 16S
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière / Dynamic Light Scattering
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage / Differential Scanning Calorimetry
EDX	Energie Dispersive des Rayons X / Energy Dispersive X-ray
EPS	Exopolysaccharide
EtOH	Ethanol
MEB / SEM	Microscopie Electronique à Balayage / Scanning Electron Microscopy
MeOH	Méthanol
MET / TEM	Microscopie Electronique en Transmission / Transmission Electron Microscopy
MOF	Metal Organic Framework
P(3HB)	Poly(3-hydroxybutyrate)
P(3HHx)	Poly(3-hydroxyhexanoate)
P(3HO)	Poly(3-hydroxyoctanoate)
P(3HU)	Poly(3-hydroxyundecenoate)
P(3HV)	Poly(3-hydroxyvalerate)
P(4HB)	Poly(4-hydroxybutyrate)
PCL	Poly( $\epsilon$ -caprolactone)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Poly(éthylène glycol)
PHA	Poly(hydroxyalcanoate)

PhaC	PHA synthase ( <i>phaC</i> : gène)
PHAmcl	Poly(hydroxyalcanoate) medium chain length / à moyennes chaînes
PHAscl	Poly(hydroxyalcanoate) short chain length / à courtes chaînes
PLA	Poly(acide lactique)
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
SEC	Chromatographie d'Exclusion Stérique / Size Exclusion Chromatography
THF	Tétrahydrofurane

# INTRODUCTION GENERALE



Alors que le XX<sup>e</sup> siècle a incontestablement privilégié la fabrication et l'usage de molécules synthétiques dans tous les domaines scientifiques, le XXI<sup>e</sup> semble fermement s'orienter vers les biotechnologies (Cantor, 2000; Gavrilescu and Chisti, 2005; Bachmann *et al.*, 2014). Selon l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE), le domaine des biotechnologies vise à employer des organismes ou composés issus de ressources biologiques, pour promouvoir la conception de matériaux vivants ou inertes, à des fins de production de connaissances, de biens ou de services ([www.ocde.org](http://www.ocde.org)).

En effet, suite à une récente double prise de conscience mondiale liée aux réserves limitées en énergie fossile et à l'accumulation excessive de déchets polluants sur la planète, toujours plus d'efforts sont dispensés quant à l'utilisation de procédés jugés plus naturels et respectueux de l'environnement, que ce soit dans les domaines agricoles, industriels ou encore pharmaceutiques et biomédicaux.

C'est dans ce contexte de volonté de développement de modes de consommation raisonnée et de produits limités en composés pétrochimiques que les **Poly(HydroxyAlcanoates) (PHA)** s'imposent. Les PHA sont des polyesters synthétisés à partir de micro-organismes isolés de l'environnement, par simple processus de fermentation de ressources carbonées naturelles. Outre leur caractère **biosourcé**, les PHA possèdent également des propriétés de **biodégradabilité** et de **biocompatibilité** particulièrement intéressantes pour un usage dans des domaines de pointe, telle que la thérapeutique.

Forts de ces préoccupations et disposés à combiner leurs compétences, les chercheurs du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (**LM2E**) de Brest, et de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (**ICMPE**) de Thiais, proposent de montrer les potentialités des PHA bactériens issus de la biodiversité marine pour l'élaboration de matériaux d'intérêt biomédical, et plus particulièrement de nanoparticules à visée thérapeutique.

Ce contrat de recherche doctorale a été financé par l'Ifremer (Institut Français de Recherche sur l'Exploitation de la Mer) et une allocation de recherche doctorale (ARED), octroyée par la région Bretagne.

Face à la biodiversité des fonds marins, une méthode de criblage par technique moléculaire PCR a été mise au point, pour la détection de bactéries marines potentiellement productrices de copolymères de poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) P(3HB4HB). Ainsi, les expériences seraient menées sur des micro-organismes issus de sites hydrothermaux des océans Atlantique et Pacifique, échantillonnés lors de campagnes océanographiques Ifremer.

Dans un deuxième temps et une fois le criblage des souches bactériennes terminé, il s'agissait de concevoir des protocoles de production de PHA par fermentation cellulaire, de manière à obtenir des copolymères de P(3HB4HB) aux rendements et ratios d'unités 4-hydroxybutyrate (4HB) les plus élevés possibles.

En parallèle, dans une démarche d'amélioration de nos connaissances de la biodiversité bactérienne marine, un dernier objectif d'exploration visait à étudier la taxonomie et les inférences phylogénétiques des souches productrices de PHA, afin d'accéder à cette population particulière, associée aux environnements marins profonds.

La seconde partie de cette thèse s'est intéressée à l'utilisation des PHA comme systèmes de libération contrôlée de principes actifs. En parallèle, les nanoparticules de type Metal-Organic Frameworks (MOF), à visée thérapeutique, ont déjà montré toutes leurs potentialités, mais également leurs limites en matière de stabilité en milieu physiologique. Par conséquent, des PHA fonctionnalisés, greffés à la fois de fonctions sulfonates permettant l'accrochage du polymère à la surface des MOF, et de poly(éthylène glycol) apportant des propriétés de furtivité au polymère, ont été synthétisés pour l'élaboration de systèmes hybrides poreux MOF-PHA. Ce travail a été réalisé à l'ICMPE, principalement sur des PHA à moyennes chaînes de type poly(3-hydroxyoctanoate-3-hydroxyundecenoate) P(3HO3HU).

Enfin, en collaboration avec l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), la biocompatibilité de ces nouveaux systèmes hybrides poreux MOF-PHA a été évaluée vis-à-vis de cellules immunitaires ou macrophages, par des tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire.

# CHAPITRE I

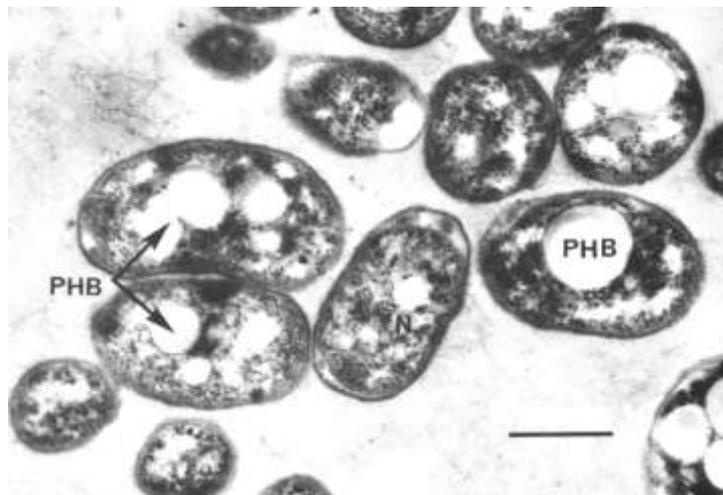
## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES POLY(HYDROXYALCANOATES)



# I. 1. Présentation des Poly(HydroxyAlcanoates)

## I. 1. 1. Découverte des PHA

Au début du siècle dernier, suite aux progrès réalisés en matière de microscopie et à l'intérêt des chercheurs pour la microbiologie, le scientifique français Maurice Lemoigne centre ses recherches autour d'un micro-organisme alors largement représenté dans les sols, *Bacillus megaterium*. Il indique ainsi qu'en l'absence d'oxygène, cette bactérie Gram positif semble accumuler une substance particulière, sous forme d'inclusions intracellulaires (Lemoigne, 1926, 1927).



**Figure 01.** Image de microscopie électronique de la souche bactérienne *Ferrobacillus ferrooxidans* en phase d'accumulation intracellulaire de P(3HB). Barre d'échelle = 500 nm. D'après Wang et Lundgren (1969).

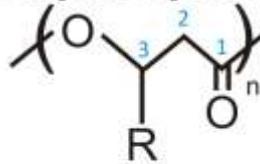
Quarante ans plus tard, Lundgren *et al.* (1964, 1965; Wang and Lundgren, 1969) affirment que certaines souches sont à l'évidence capables de synthétiser un polymère naturel, qu'ils caractérisent de poly(3-hydroxybutyrate) ou P(3HB) (**Figure 01**). Au cours des années 1970, les avancées technologiques en matière d'analyses chimiques permettront d'identifier ce polyester cristallin comme premier composé de la famille des **Poly(HydroxyAlcanoates)** ou **PHA** (Dawes and Senior, 1973; Braunegg *et al.*, 1978). Plus tard, de nombreuses études démontrent que ces poly(hydroxyalcanoates) sont des biopolymères

universels, car synthétisés par des organismes appartenant aux trois domaines du vivant (*Eubacteria*, *Archaeobacteria* et *Eukaryota*) (Anderson and Dawes, 1990).

En particulier chez les micro-organismes bactériens, les PHA sont par définition des **molécules de réserve énergétique** produites en réponse à un stress environnemental, à savoir une carence en éléments nécessaires au développement cellulaire (azote, oxygène, phosphore etc.), couplée à un apport en excès d'une source de carbone (glucidique ou lipidique) (Lee *et al.*, 1999). Les PHA sont stockés sous la forme d'inclusions hydrophobes ou **granules intracellulaires**, et peuvent occuper plus de 90% du volume cellulaire bactérien (Doi *et al.*, 1990; Rehm, 2010). De plus, en raison de leur faible solubilité et de leur masse molaire élevée, les granules de PHA n'exercent qu'une faible pression osmotique sur les parois cellulaires, et affectent très peu le métabolisme de l'individu (Grage *et al.*, 2009; Jendrossek and Pfeiffer, 2014). Ainsi, les PHA sont des polyesters amorphes au sein des cellules, et font partie d'un cycle continu de biosynthèse et de dégradation pour assouvir les besoins énergétiques cellulaires, et ainsi **assurer la survie** de l'organisme (Kadouri *et al.*, 2005; Obruca *et al.*, 2016).

A ce jour, plus de **150 motifs** différents de poly(hydroxyalcanoates) sont décrits dans la littérature, synthétisés par des organismes natifs ou recombinants, faisant des PHA la famille de biopolymères la plus vaste connue (Steinbüchel, 2001; Keshavarz and Roy, 2010). D'un point de vue structural, les PHA sont classés en trois catégories en fonction du nombre d'atomes de carbone présents sur la chaîne latérale R du monomère : 3 à 5 carbones par motif pour les **PHAscl** (short-chain-length, à courtes chaînes), 6 à 14 pour les **PHAmcl** (medium-chain-length, à moyennes chaînes), et au minimum 15 pour les **PHAcl** (long-chain-length, à longues chaînes) (Lu *et al.*, 2009) (**Figure 02**).

## poly(3-hydroxyalcanoate)

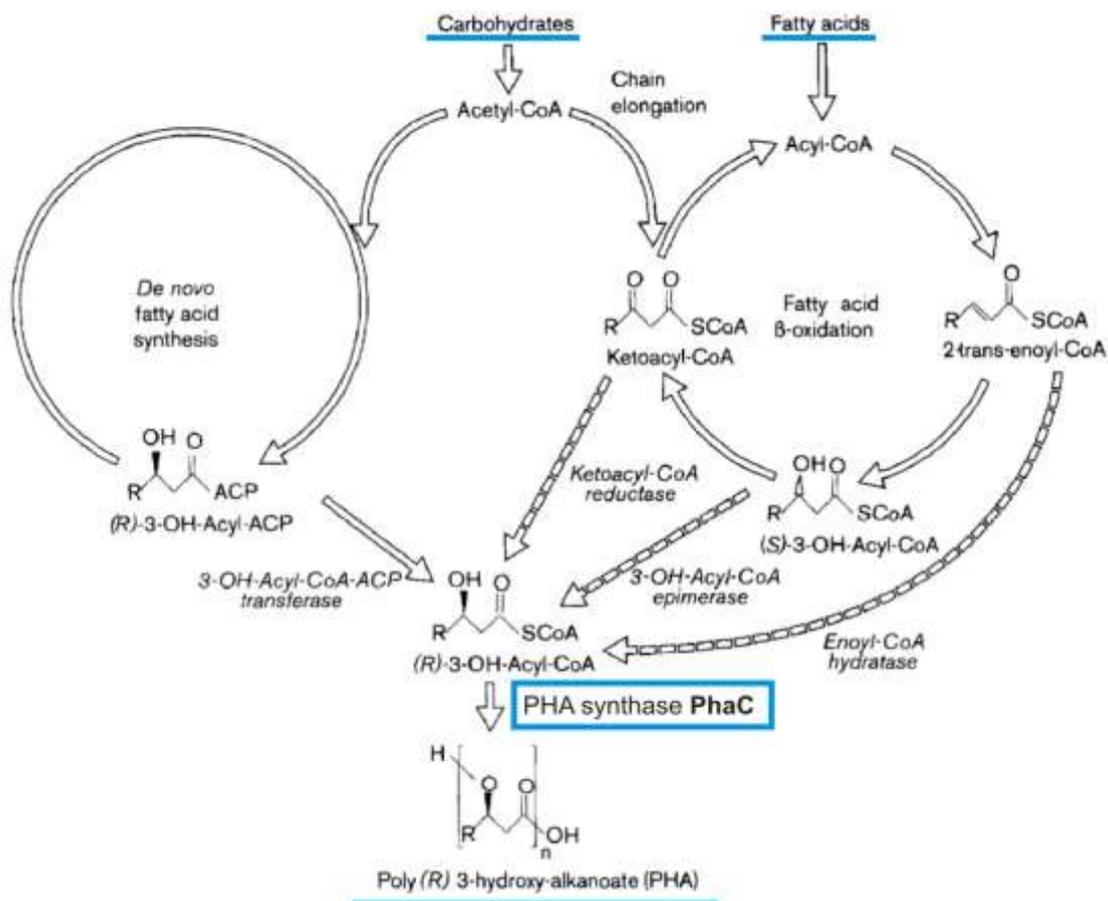


Groupe R	Nombre de C	Nom PHA	Catégorie
methyl	4	poly-(3-hydroxybutyrate)	PHAscl
ethyl	5	poly-(3-hydroxyvalerate)	
propyl	6	poly-(3-hydroxyhexanoate)	
butyl	7	poly-(3-hydroxyheptanoate)	PHAmcl
pentyl	8	poly-(3-hydroxyoctanoate)	
hexyl	9	poly-(3-hydroxynonanoate)	
heptyl	10	poly-(3-hydroxydecanoate)	
octyl	11	poly-(3-hydroxyundecenoate)	
nonyl	12	poly-(3-hydroxydodecenoate)	PHAicl
decyl	13	poly-(3-hydroxytridecenoate)	
undecyl	14	poly-(3-hydroxytetradecenoate)	
dodecyl	15	poly-(3-hydroxypentadecenoate)	
tridecyl	16	poly-(3-hydroxyhexadecenoate)	

**Figure 02.** Structure générale des poly(3-hydroxyalcanoates).

### I. 1. 2. Biosynthèse des PHA

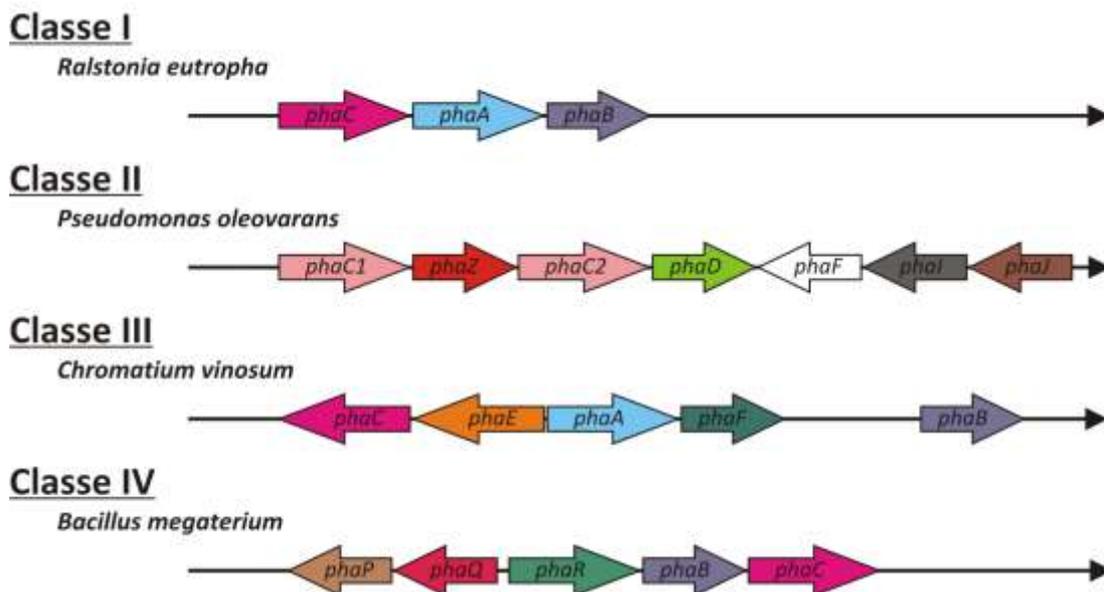
D'un point de vue fonctionnel, la biosynthèse bactérienne des PHA s'effectue à partir d'une enzyme clé, la PHA synthase. La **PHA synthase**, ou protéine PhaC, catalyse la conversion d'un substrat monomérique hydrosoluble en un polymère liposoluble de masse molaire élevée (200-3000 kDa). Cette protéine induit la polymérisation du (R)-3-hydroxyacyl-Coenzyme A, molécule intermédiaire des cycles de dégradation des glucides et des acides gras, en PHA (Witholt and Kessler, 1999) (**Figure 03**).



**Figure 03.** Voies de biosynthèse des poly(3-hydroxyalcanoates).  
D'après Witholt et Kessler, 1999.

Chez les micro-organismes bactériens, quatre types d'opérons ou unités d'ADN fonctionnelles codant pour l'enzyme clé PHA synthase sont recensés, où chaque organisation génétique détient un ensemble de gènes spécifiques (Rehm, 2003, 2006; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Tsuge *et al.*, 2015) (**Figure 04**).

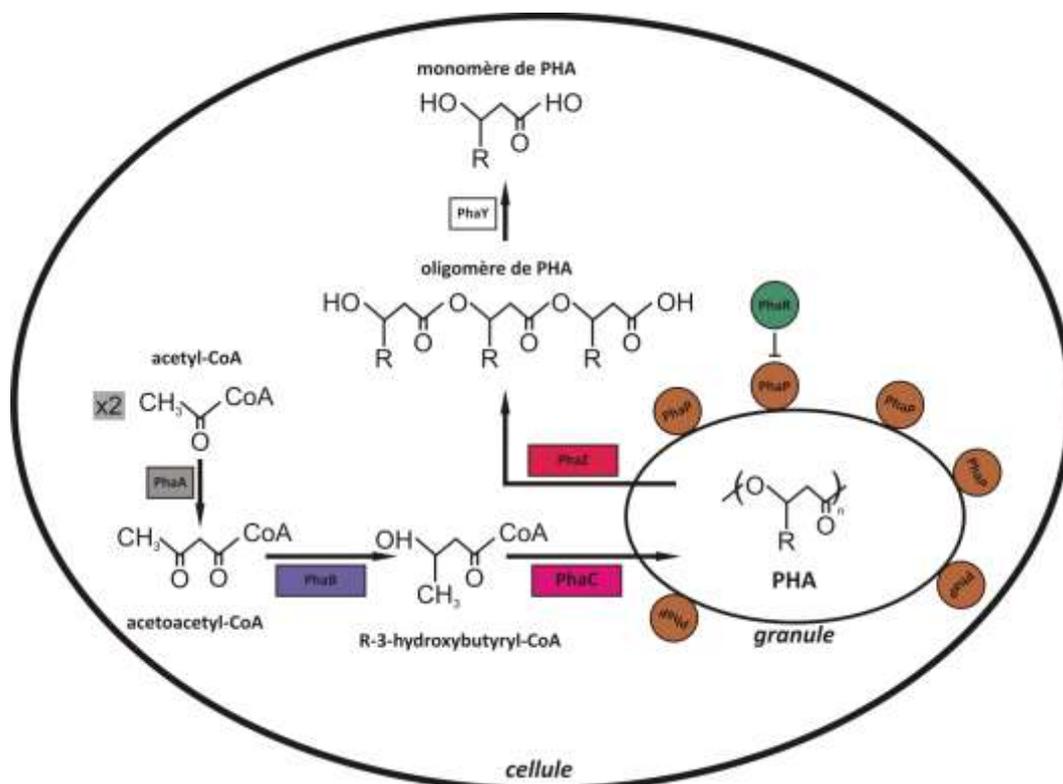
La **PHA synthase de type I** ou PhaC a été découverte chez l'organisme modèle *Ralstonia eutropha* (Peoples and Sinskey, 1989),  $\beta$ -protéobactérie ubiquitaire des sols et eaux douces. PhaC initie la polymérisation des PHA, et est traduite à partir des gènes de l'opéron *phaCAB* (Pohlmann *et al.*, 2006), constitué des gènes *phaC* (PHA synthase), *phaA* ( $\beta$ -ketothiolase), différencié en 37 isologues pour s'adapter au substrat carboné rencontré (Slater *et al.*, 1998), et *phaB* (acetoacyl-CoA reductase NADPH dépendante) dont il existe également 15 isologues.



**Figure 04.** Organisation des opérons codant les PHA synthases de types I, II, III et IV. **phaC/C1/C2** : PHA synthase. **phaA** :  $\beta$ -ketothiolase. **phaB** : acetoacyl-CoA réductase NADPH dépendante. **phaZ** : PHA dépolymérase. **phaD/phaE/phaQ/phaR** : protéine de régulation. **phaF/phaI/phaP** : phasines. **phaJ** : enoyl CoA hydratase. D'après Rehm, 2003, 2010, Jendrossek et al., 2014 et Tsuge et al., 2015.

Par ailleurs, d'autres gènes directement impliqués dans la synthèse des PHA ont été identifiés, tels les gènes appartenant à la famille *phaP*, codant quatre phasines amphiphiles assurant l'agencement d'une membrane à la surface des granules de PHA, pour contrôler leur synthèse, taille et nombre (Pötter et al., 2002; Mezzina and Pettinari, 2016).

En parallèle, des gènes de type *phaR* sont décrits, codant des protéines de régulation directement liées à la répression de l'expression de ces mêmes phasines, afin d'ajuster la synthèse de polymères (Prieto et al., 1999; Maehara et al., 2002; York et al., 2002). De plus, deux groupes supplémentaires de gènes ont été mis en évidence, comptant sept gènes *phaZ* codant la PHA dépolymérase, et deux autres gènes *phaY* (hydrolase d'oligomères de PHA), agissant de concert pour dégrader les motifs de PHA néosynthétisés, sources d'énergie cellulaire (Tseng et al., 2006; Jendrossek and Pfeiffer, 2014). Un schéma récapitulatif permettant d'illustrer toutes ces interactions est proposé en **Figure 05**.



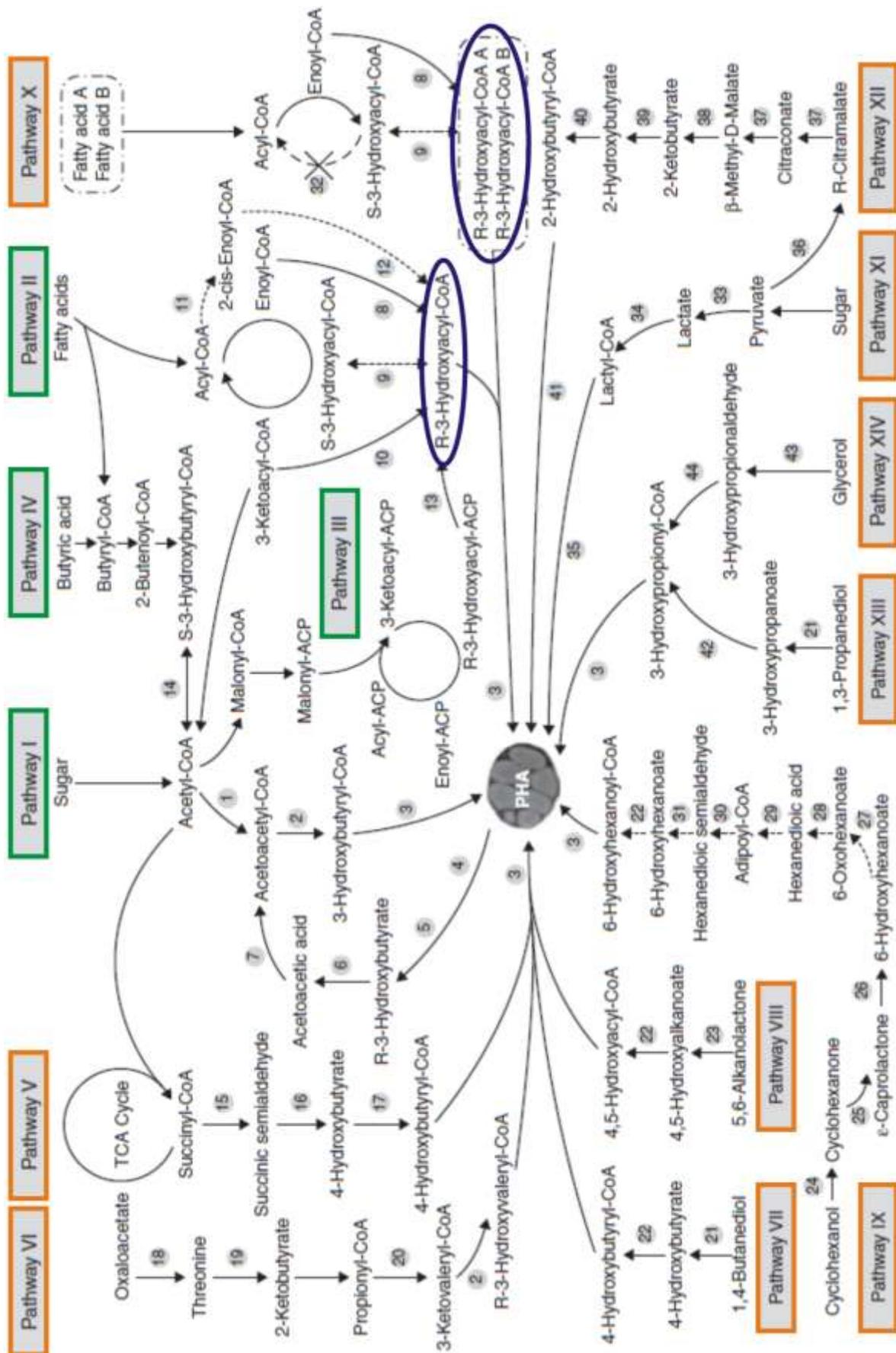
**Figure 05.** Schéma récapitulatif des interactions entre les protéines impliquées dans la synthèse des PHA.  
 D'après Pohlmann et al., 2006.

Quelques années plus tard, trois autres types d'opérons ont été découverts à partir d'autres souches bactériennes modèles, au sein desquelles différents gènes *phaC* ont été répertoriés (**Figure 04**). La **PHA synthase de type II**, majoritairement retrouvée chez les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas*, est codée par un agencement génétique composé de deux gènes correspondants aux deux sous-unités de la PHA synthase de type II, *phaC1* et *phaC2* (Huisman et al., 1991; Nishikawa et al., 2002; Prieto et al., 2016). D'autre part, la **PHA synthase de type III**, mise en évidence chez *Chromatium vinosum*, est constituée de deux sous-unités codées par les gènes *phaC* et *phaE* (Rehm and Steinbüchel, 1999). Enfin, les gènes de l'opéron codant la **PHA synthase de type IV** ont été décrits chez l'espèce Gram positif *Bacillus megaterium* (McCool and Cannon, 1999).

D'une manière générale, que ce soit dans l'environnement ou en conditions de laboratoire, la composition des PHA varie en fonction de la souche bactérienne et des sources de carbone disponibles dans le milieu (Steinbüchel and Valentin, 1995; Jiang et al., 2016). Ainsi, de nombreuses études rapportent les capacités des procaryotes à synthétiser

tout type de PHA, y compris à partir de substrats parfois originaux tels le glucose, l'acide oléique, le glycérol, l'huile de coprah, la mélasse ou les co-produits cosmétiques (Lemos *et al.*, 1998; Kellerhals *et al.*, 2000; Zinn *et al.*, 2003; Ashby *et al.*, 2005; Christelle Simon-Colin, Raguénès, Costa, *et al.*, 2008; Simon-Colin *et al.*, 2009).

A ce jour, quatre voies métaboliques natives ont été identifiées et déterminent les différents processus bactériens de production de PHA. Celles-ci sont classées selon le type de PHA synthase codée par la souche microbienne impliquée, et le substrat carboné consommé (glucides ou acides gras). Ainsi, aux voies métaboliques originelles I, II, III et IV exposées en **Figure 06** s'ajoutent les voies V à XIV, développées en laboratoire à l'aide d'organismes recombinants (Meng *et al.*, 2014). Par ailleurs, les multiples travaux menés sur des souches génétiquement modifiées ont permis d'étendre les connaissances sur les mécanismes moléculaires de synthèse des PHA, mais également d'initier la production de nouveaux copolymères (Yue *et al.*, 2014).



**Figure 06.** Voies métaboliques de biosynthèse des PHA.  
 (voies de synthèse naturelles (vert) et issues du génie génétique (orange))  
 D'après Meng et al., 2014.

### I. 1. 3. Rôles écophysiologicals des PHA bactériens

Depuis près de 3,7 milliards d'années, les bactéries colonisent tout type d'écosystème à travers le globe (Knoll, 2015; Pearce *et al.*, 2018), et ont su résister face aux fluctuations environnementales en matière de température, pH, potentiel rédox ou osmolarité (Hug *et al.*, 2016; Obruca *et al.*, 2016). Pour survivre dans ces conditions drastiques, les bactéries ont développé des systèmes combinant diverses stratégies de survie (Marles-Wright and Lewis, 2007; Baharoglu and Mazel, 2014).

Une des stratégies de réponse au stress les plus connues et appliquées par les micro-organismes halophiles et/ou thermophiles est l'accumulation de **solutés compatibles**. Les solutés compatibles sont des molécules hydrosolubles de faible masse molaire, accumulés dans le cytoplasme des cellules en tant qu'osmolytes, permettant d'équilibrer la pression osmotique entre le cytosol et le milieu extérieur (Roberts, 2005; Lebre *et al.*, 2017; Vyrides and Stuckey, 2017). Ces solutés sont divisés en plusieurs catégories (acides aminés, polyols, glucides, ectoines etc.) et luttent non seulement contre le stress osmotique mais protègent également les cellules, protéines et autres molécules labiles de nombreux stress environnementaux tels que les hautes (Van-Thuoc *et al.*, 2013) ou les faibles températures (Liljeqvist *et al.*, 2015), le pH (Galleguillos *et al.*, 2018) ou les espèces réactives de l'oxygène (ou reactive oxygen species, ROS) (Chen and Murata, 2002; Sarker and Oba, 2018). Les solutés compatibles sont ainsi qualifiés de molécules chaperonnes et font aujourd'hui l'objet d'applications industrielles et biotechnologiques (Yin *et al.*, 2015; Waditee-Sirisattha *et al.*, 2016).

Dans une autre catégorie, les **poly(hydroxyalcanoates)** sont également des molécules intracellulaires, des polymères de masse molaire importante, accumulés sous forme de granules chez de nombreux genres bactériens. A visée **énergétique**, le mécanisme de biosynthèse des PHA est cyclique et s'équilibre entre stockage de sources carbonées et dégradation en oligomères pour une consommation en tant que substrats en cas de carences nutritives dans l'environnement, assurant ainsi la survie de l'individu (Kadouri *et al.*, 2005).

Outre ce rôle de stockage énergétique, plusieurs études ont démontré l'augmentation de la survie des souches bactériennes capables de produire des PHA par rapport à des micro-organismes dépourvus de cette aptitude en milieux aquatique et terrestre (Matin *et al.*, 1979; López *et al.*, 1995; Ruiz *et al.*, 2001; Kadouri *et al.*, 2005). De plus, des travaux ont associé les capacités d'accumulation et de dégradation des PHA à la **résistance** bactérienne au stress oxydatif (Goh *et al.*, 2014; López *et al.*, 2015). Ainsi, les granules de PHA augmentent la survie bactérienne en induisant la surexpression de gènes codant des protéines de stress (Ruiz *et al.*, 2001; Y. H. Zhao *et al.*, 2007; Raiger-lustman and Ruiz, 2008), menant notamment à la production de molécules anti-oxydantes (Kadouri *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2004; Ayub *et al.*, 2009).

De la même manière, la synthèse de PHA est reconnue comme stratégie de lutte contre le choc osmotique chez les micro-organismes marins (Yin *et al.*, 2015; Obruca *et al.*, 2018), ou la résistance vis-à-vis des hautes (Wu *et al.*, 2011; Raiger lustman *et al.*, 2015) ou basses températures (Ayub *et al.*, 2009; Pavez *et al.*, 2009; Pärnänen *et al.*, 2015; Raiger lustman *et al.*, 2015; Hauschild *et al.*, 2017). Enfin, les monomères de 3-hydroxybutyrate dégradés à partir du P(3HB) cellulaire sont désormais considérés comme solutés compatibles, ayant pour fonction la protection des protéines contre les phénomènes d'agrégation, en cas de stress salin et thermique (Martin *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2012).

Bien que ces mécanismes restent à ce jour peu expliqués, les capacités de biosynthèse des PHA constituent un réel atout d'**adaptabilité** et de **survie** pour les micro-organismes, et plus particulièrement ceux exposés aux conditions environnementales extrêmes.

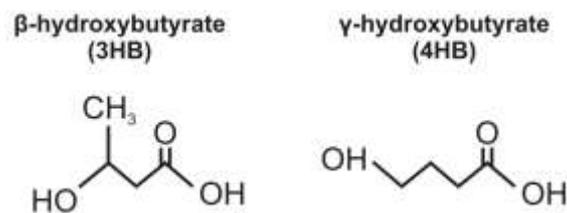
## I. 1. 4. Rôles des monomères de PHA chez l'Homme

Dès les années 1970, la présence de monomère d'hydroxycanoates a été mise en évidence chez tout être vivant, y compris chez l'Homme (Adam *et al.*, 1975; Robinson and Williamson, 1980; Müller and Seebach, 1993). Ainsi, le  **$\beta$ -hydroxybutyrate** (ou 3HB) est

présent dans la paroi cellulaire des eucaryotes, dans le sang à des concentrations comprises entre 0,6 et 18,2 mg/L, et entre 30 et 60 mg/L dans le sérum (Zinn *et al.*, 2001) (**Figure 07**).

Le 3HB est à ce jour reconnu non seulement pour son rôle énergétique en tant que précurseur de lipogénèse, mais également pour ses propriétés anti-convulsivantes (Yum *et al.*, 2012) et neuroprotectrices (Yamanashi *et al.*, 2017). Par ailleurs, il représente la majorité des corps cétoniques produits par le foie suite à la dégradation des acides gras chez l'humain, avant d'être acheminé à travers le plasma sanguin jusqu'aux tissus périphériques (Y. Zhao *et al.*, 2007).

D'un point de vue médical, des tests sanguins basés sur la titration des unités 3HB, alors assimilées comme marqueurs, ont été mis au point pour confirmer le décès soudain par hypoglycémie chez des malades alcooliques chroniques (Denmark, 1993), ou afin d'alerter au quotidien les personnes diabétiques déficientes en insuline, en situation d'acidocétose (Arora and Menchine, 2012).



**Figure 07.** Structure chimique du 3-hydroxybutyrate et du 4-hydroxybutyrate.

Un second monomère appartenant à la famille des hydroxyalcanoates suscite l'intérêt du corps médical. Retrouvé en concentrations proches des 25  $\mu\text{mol/L}$  dans le cerveau, le  **$\gamma$ -hydroxybutyrate** (ou 4HB) est un métabolite issu du neurotransmetteur GABA, neurorégulateur essentiel au développement embryonnaire et à l'équilibre cognitif de tous les animaux (Maitre, 1997) (**Figure 07**). Le 4HB contribue par ailleurs à la réduction de la consommation énergétique dans l'organisme et à la protection des tissus en cas d'hypoxie et autres stress oxydatifs (Mamelak, 1989). Néanmoins, les rôles précis imputés aux unités 4HB chez l'Homme restent à ce jour largement méconnus, d'autant plus que la majorité des études menées se focalisent d'avantage sur les méfaits du 4HB utilisé comme stupéfiant, ou en tant que nouveau thérapeutique dans le cadre d'affections psychiques (Kamal *et al.*, 2016).

Toutefois, la présence et les différentes fonctions métaboliques imputées aux monomères d'hydroxyalcanoates au sein des organismes vivants contribuent à expliquer le caractère **biocompatible** des PHA (Hazer *et al.*, 2012). Par ailleurs, la dégradation des PHA, qu'ils soient sous forme d'oligomère ou de polymère, n'engendre aucune production de dérivés toxiques, et la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des PHA encourage leur usage en tant que matériau pour des applications biomédicales (Nigmatullin *et al.*; Li *et al.*, 2016).

### I. 1. 5. Biosynthèse et potentiels des copolymères de P(3HB4HB)

Depuis quelques décennies, un intérêt particulier est porté sur la production de poly(4-hydroxybutyrate) P(4HB), qui est à ce jour le seul PHA autorisé par la Food and Drug Administration (FDA) pour des applications dans le domaine biomédical (Williams *et al.*, 2013; Boesel *et al.*, 2014). Le P(4HB) est un PHA à courtes chaînes résistant et fortement ductile, et la présence de monomères de 4HB au sein de copolymères de **P(3HB4HB)** engendre une certaine flexibilité du matériau, plus approprié pour de nombreux usages thérapeutiques (Martin and Williams, 2003). Par ailleurs, l'entreprise américaine Tepha Inc est aujourd'hui la seule manufacture à pouvoir commercialiser des produits à base de P(4HB), sous forme de sutures résorbables ou de mèches chirurgicales.

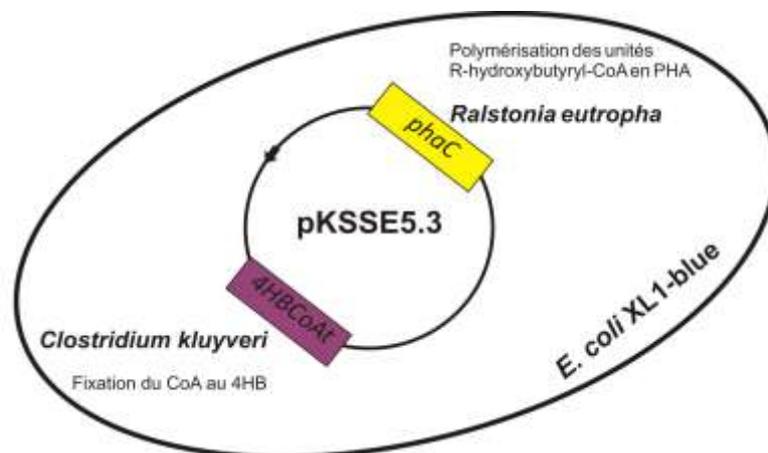
Concernant la recherche académique, le P(4HB) et ses copolymères de P(3HB4HB) sont synthétisés depuis près de 30 ans, à partir de procédés naturels de fermentation bactérienne (Kunioka *et al.*, 1989; Saito and Doi, 1994; Choi *et al.*, 1999; Huu Phong *et al.*, 2016) ou *via* des souches génétiquement modifiées (Song *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Le Meur *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2013; Kämpf *et al.*, 2014). Ces travaux ont par ailleurs conduit à la synthèse de matériaux à visée thérapeutique, et notamment de nanoparticules (Shah *et al.*, 2010, 2012) ou de supports pour la régénération cellulaire (Pan *et al.*, 2009; Wee *et al.*, 2017), à ce jour au stade exploratoire.

D'un point de vue moléculaire et alors que les voies de biosynthèse des PHAscl sont décrites depuis 1989 par Peoples et Sinskey, la conversion des unités monomériques de 4-

hydroxybutyrate (4HB) en P(4HB) est longtemps restée énigmatique. En 1991, les scientifiques Scherf et Buckel s'intéressent aux processus de fermentation chez la bactérie ubiquiste *Clostridium aminobutyricum*, principalement connue comme colonisatrice non pathogène du tractus digestif humain. Leurs travaux permettent alors d'élucider les voies de synthèse et de dégradation du 4-hydroxybutyrate chez cette bactérie, et de mettre en évidence l'enzyme **4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transferase** ou **4HBCoAt**, protéine responsable de la formation du 4-hydroxybutyryl-CoA à partir du 4HB et du coenzyme A.

Quelques années plus tard, les travaux de Valentin *et al.* (1995) tentent de déterminer la voie de biosynthèse du P(4HB) chez l'organisme modèle *Ralstonia eutropha*, sans parvenir à identifier toutes les protéines impliquées. En parallèle et dans un autre contexte d'études, Söhling et Gottschalk (1996) explorent la fermentation de l'éthanol et de l'acétate d'un point de vue génétique chez la bactérie pathogène *Clostridium kluyveri*, et découvrent le gène *orfZ*, dont la fonction demeure alors inconnue. Ce n'est qu'en 1997 que Hein *et al.* démontrent que le gène *orfZ* code en réalité la protéine 4HBCoAt, elle-même responsable de la fixation du coenzyme A au 4HB pour générer du 4-hydroxybutyryl-CoA, intermédiaire indispensable à la polymérisation du 4HB chez les bactéries.

Cette équipe sera par ailleurs la première à concevoir un micro-organisme recombinant capable de produire du P(4HB) à partir d'un plasmide portant les deux gènes *phaC* et *4HBCoAt*, ensuite inséré chez la souche compétente *Escherichia coli* XL1-Blue (**Figure 08**). Ces constructions plasmidiques sont actuellement toujours utilisées en génie génétique, pour la synthèse de P(4HB) et de copolymères de P(3HB4HB) à partir de micro-organismes génétiquement modifiés.



**Figure 08.** Représentation du plasmide pKSSE5.3 portant les gènes *phaC* et *4HBCoAt* chez la bactérie compétente *E. coli* XL1-blue.

Finalement, Macieira *et al.* (2009, 2012) réalisent l'étude cristallographique de la protéine 4HBCoAt, caractérisent sa structure tridimensionnelle et les positions de ses sites fonctionnels (complexes protéine-substrats). A ce jour, aucune autre protéine capable de condenser le coenzyme A au 4-hydroxybutyrate n'a été décrite, la 4HBCoAt semble donc être la seule structure protéique apte à initier la polymérisation du 4HB dans la nature, aussi bien chez les eucaryotes que chez les procaryotes.

## I. 2. Méthodes de détection de bactéries productrices de PHA

Comme exposé précédemment, de nombreux micro-organismes sont capables de synthétiser des PHA en conditions particulières de déséquilibre énergétique, c'est-à-dire lorsque subviennent simultanément une carence en éléments nécessaires au développement cellulaire et un excès de sources carbonées. Afin de repérer les micro-organismes producteurs, plusieurs méthodes de détection ont été décrites, basées sur la présence effective de PHA au sein des cellules, ou sur la détection des gènes impliqués dans la biosynthèse des PHA.

### I. 2. 1. Techniques de criblage non moléculaire

Dès les années 1970, des méthodes de criblage **colorimétrique** ont été élaborées pour la mise en évidence des granules de PHA. Elles utilisent des colorants liposolubles tels le Nile Red, le Nile Blue ou le Sudan Black, qui réagissent en s'agglutinant à l'enveloppe entourant les granules de PHA dans le cytosol des micro-organismes, pour émettre une coloration visible en microscopie à lumière blanche (Schlegel *et al.*, 1970; Ostle and Holt, 1982; Spiekermann *et al.*, 1999).

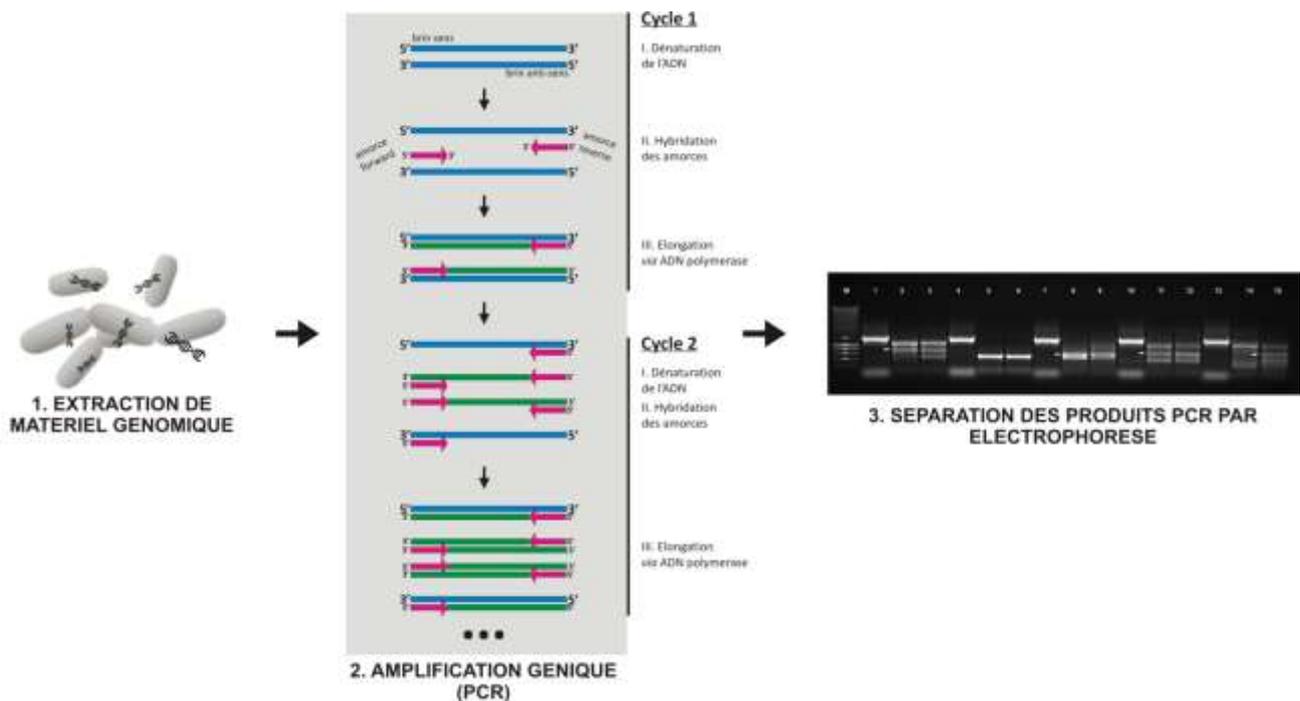
Néanmoins, ces techniques ne sont pas adaptées dans le cadre de protocole de criblage ciblé, puisque celles-ci ne s'avèrent efficaces que si les cellules microbiennes sont d'ores et déjà cultivées en phase d'accumulation de PHA. De plus et malgré un coût abordable, ces techniques peu spécifiques et fastidieuses ne délivrent que des informations partielles quant à la production de polymères, dans le sens où le type de PHA produit (PHAscl ou PHAmcl) ne peut être distingué. Ces colorants peuvent également marquer tout type d'inclusion lipidique, et mener ainsi à l'obtention de résultats faux positifs.

## I. 2. 2. Techniques de criblage moléculaire

Dans les années 1990, l'essor de la **biologie moléculaire** a initié le développement de méthodes de criblage plus fines, notamment pour la détection de micro-organismes producteurs de PHA. En effet, ces techniques moléculaires permettent de cibler et de révéler les gènes, acides ribonucléiques ou protéines, impliqués dans le métabolisme de biosynthèse des PHA, au moyen de procédés d'amplification génique telle la réaction en chaîne par polymérase (ou Polymerase Chain Reaction, **PCR**), ou d'identification protéique à partir d'anticorps spécifiques dans le cas d'expériences d'immuno-empreintes (**Western blot**).

Ainsi, plusieurs méthodes de criblage ont été spécialement conçues pour la recherche de micro-organismes producteurs de PHA, les plus nombreuses étant basées sur le principe d'amplification génique par PCR. En effet, la PCR permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN connue (en l'occurrence un gène cible) à partir du patrimoine génétique complet d'un organisme, à l'aide d'**amorces PCR spécifiques** de la séquence d'intérêt. Ces amorces PCR sont constituées d'oligonucléotides de synthèse comptant 18 à 30 nucléotides, complémentaires d'un ensemble de bases peu variables, c'est-à-dire de bases conservées et fonctionnelles situées sur la séquence d'ADN. Ces bases conservées sont repérées à la suite de recherches bioinformatiques, qui consistent dans un premier temps à aligner les gènes codant une même fonction, par exemple le gène *phaC*, et appartenant à différents genres et espèces de micro-organismes. Une fois les gènes alignés, les acides nucléiques communs et partageant les mêmes positions sur la séquence ADN visée peuvent être aisément décelés.

Dès lors, deux amorces PCR sens (forward) et anti-sens (reverse) spécifiques de ces deux régions conservées, positionnées en amont et en aval du gène, sont dessinées suivant les règles universelles imposées par le code génétique, afin d'engendrer l'amplification par PCR de tous les nucléotides compris entre ces deux amorces (**Figure 09**). En fin de phase d'amplification, réalisée au moyen d'un thermocycleur, le produit PCR d'intérêt alors dupliqué en plusieurs millions d'exemplaires est isolé par électrophorèse, procédé qui permet la séparation des acides nucléiques en fonction de leur longueur.



**Figure 09.** Récapitulatif des étapes effectuées dans le cadre du criblage moléculaire par PCR.

La PCR est une technique rapide et peu onéreuse largement utilisée, notamment pour la détection de bactéries terrestres productrices de PHAscl (Sheu *et al.*, 2000) ou de PHAmcl (Solaiman *et al.*, 2000; Solaiman, 2002; Ciesielski *et al.*, 2006). De la même manière, López-Cortés *et al.* (2010) ont développé un protocole PCR pouvant détecter toute protéobactérie capable de synthétiser des PHA, mais sans distinction de catégories (PHAscl et PHAmcl), tandis que d'autres équipes scientifiques ont dessiné des amorces particulières pour cibler simultanément les gènes codant les quatre types de PHA synthases (Solaiman and Ashby, 2005; Pärnänen *et al.*, 2015). Enfin, Shamala *et al.* (2003) ont mis au point un

protocole PCR spécialement dédié à la recherche de représentants bactériens producteurs de PHA, appartenant au genre *Bacillus*.

Les amorces PCR utilisées dans ces travaux ont été conçues à partir de la biodiversité bactérienne terrestre, et ont permis d'identifier un grand nombre de nouveaux isolats capables de synthétiser des PHA. En revanche, il s'est avéré que ces amorces ne sont pas adaptées aux espèces bactériennes d'origine marine, du fait de leur position phylogénétique éloignée. En effet, le succès du criblage moléculaire par PCR dépend de la capacité des amorces à se fixer sur au moins deux régions peu variables et donc conservées d'un gène cible. Or, les amorces PCR sont dessinées en fonction des régions ADN repérées sur des gènes préalablement décrits et déposés dans la base de données NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information). Aussi à ce jour, seules quelques dizaines de gènes *phaC* sont disponibles dans la base de données, et pour la grande majorité affiliés à des bactéries isolées des sols et eaux douces.

Ainsi, la faible universalité des amorces PCR actuellement employées dans le cadre d'études de criblage moléculaire représente un frein quant à la détection de tous les genres et espèces véritablement capables de produire des PHA dans l'environnement. Plus particulièrement et s'agissant des souches bactériennes marines, ces méthodes sont pour l'instant inadaptées, et peuvent en l'état mener à l'obtention de résultats faux négatifs lors d'expériences de criblage à grande échelle.

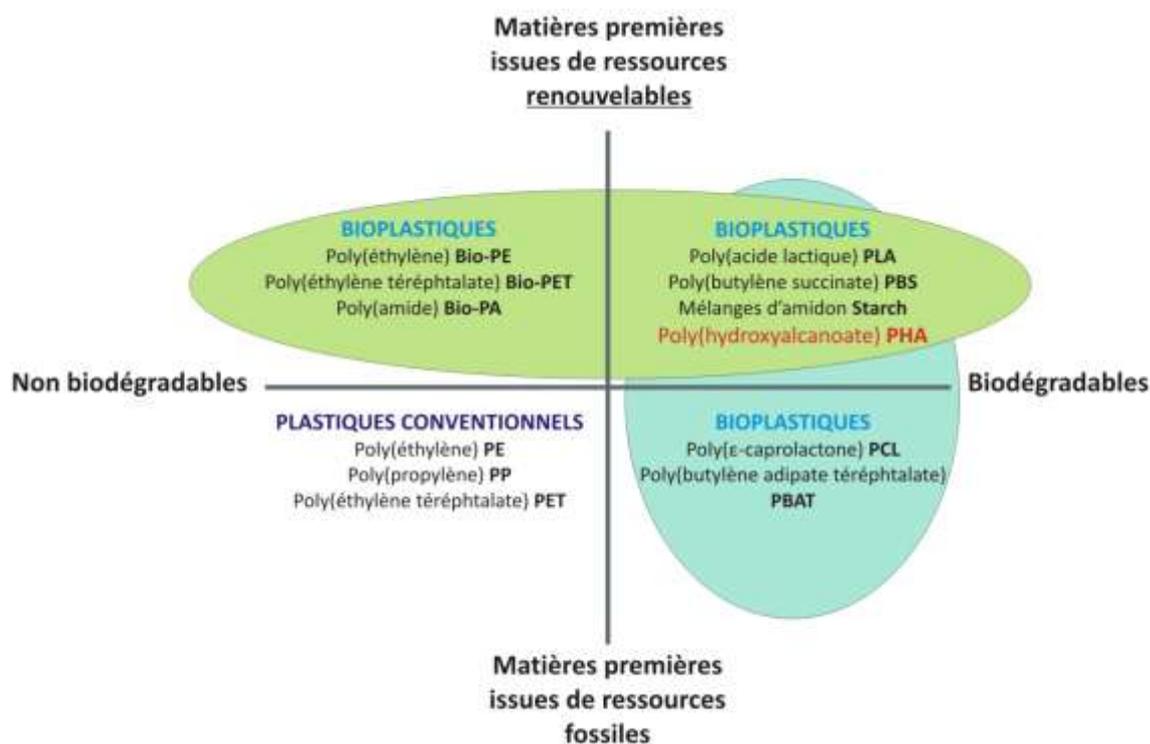
Néanmoins, la méthode de criblage moléculaire la plus fiable semble être celle décrite par Sheu *et al.* (2009), inspirée des techniques de Western blot, où il est question de déterminer l'**activité enzymatique effective** de la protéine PhaC sur gel polyacrylamide, simultanément soumise à électrophorèse. Bien que très spécifique, cette méthode basée sur le dénombrement protéique à l'aide de molécules substrats est difficilement applicable pour un travail de criblage à large spectre, en raison de son coût élevé et de son aspect chronophage.

Aujourd'hui, il existe donc plusieurs méthodes de détection de bactéries productrices de PHA, parmi lesquelles la détection des gènes par des outils de biologie moléculaire de type PCR constitue probablement la technique la plus fiable.

### I. 3. Potentialités des PHA

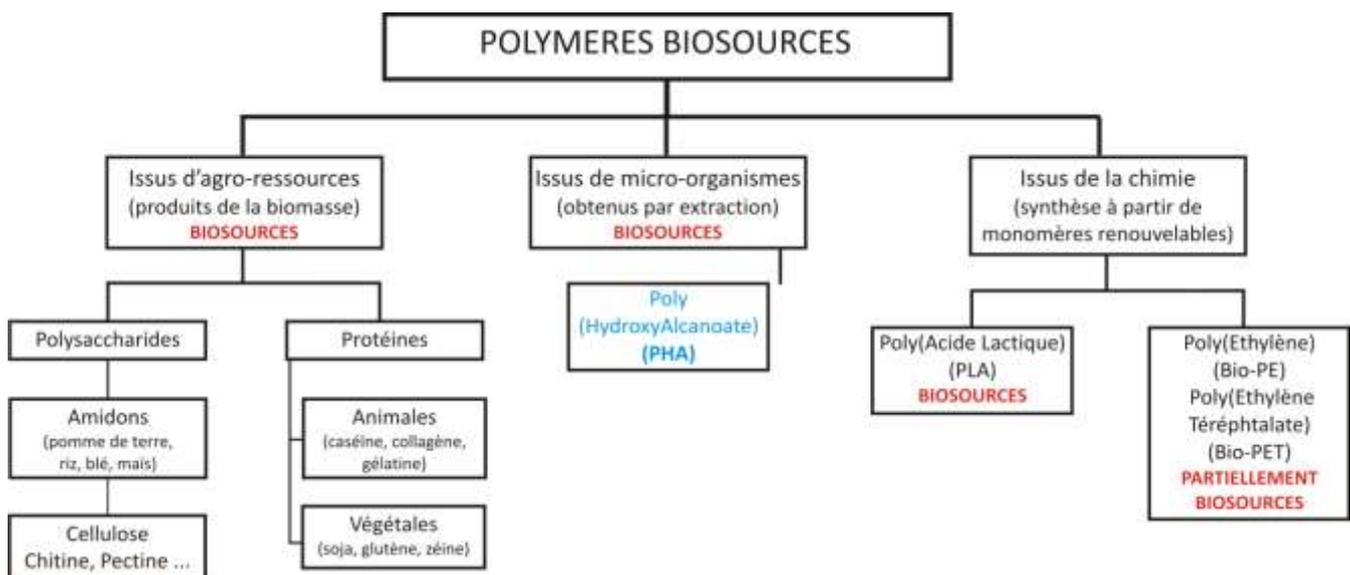
Depuis la fin du XX<sup>e</sup> siècle, l'appauvrissement du stock mondial en énergie fossile et l'accumulation problématique des déchets polluants sur la planète ont poussé les acteurs des secteurs de la recherche et de l'industrie à proposer des alternatives à l'usage des polymères d'origine pétrochimique non biodégradables. C'est dans ce contexte de volonté et de nécessité de changement en matière de consommation que depuis les années 1980 s'est développé l'intérêt pour les **bioplastiques**.

Le terme bioplastique regroupe deux types de matériaux (**Figure 10**). Il s'agit, d'une part, de matières plastiques **biosourcées**, c'est-à-dire synthétisées à partir de ressources renouvelables (végétale, animale, résiduelle ou algale), et d'autre part de matières plastiques **biodégradables** (dont compostables), décomposées par la biomasse (Avérous, 2004; Kale *et al.*, 2007; Peelman *et al.*, 2013). Les bioplastiques sont classés en **trois** catégories distinctes : les polymères biodégradables issus de ressources fossiles, les polymères non biodégradables issus de ressources renouvelables, et les polymères biodégradables issus de ressources renouvelables.



**Figure 10.** Positionnement des bioplastiques.  
D'après *European Bioplastics - Nova Institute*.

Les plastiques **biosourcés** représentent une catégorie importante des bioplastiques. Ces polymères sont produits en partie ou en totalité à partir de ressources renouvelables d'origine végétale, animale, résiduelle ou algale. Parmi les bioplastiques complètement biosourcés, certains sont issus exclusivement de la biomasse comme les agro-polymères de polysaccharides (amidon, cellulose, chitine etc.) (Lin *et al.*, 2012) et de protéines (animales ou végétales) (Hernandez-Izquierdo and Krochta, 2008), ou produits à partir de monomères renouvelables comme le Poly(Acide Lactique) (PLA) (Cheng *et al.*, 2009) (**Figure 11**). Les **Poly(HydroxyAlcanoates)** sont quant à eux les seuls polyesters 100% biosourcés produits par des micro-organismes, par fermentation de sources carbonées variées (glucides, acides gras etc.) (Peelman *et al.*, 2015). En parallèle, certains bioplastiques tels que le Poly(Ethylène) (Bio-PE) et le Poly(Ethylène Téréphtalate) (Bio-PET) sont élaborés à l'aide de procédés chimiques, à partir de 20 à 80% de ressources renouvelables, mais ne sont ni biodégradables ni compostables.



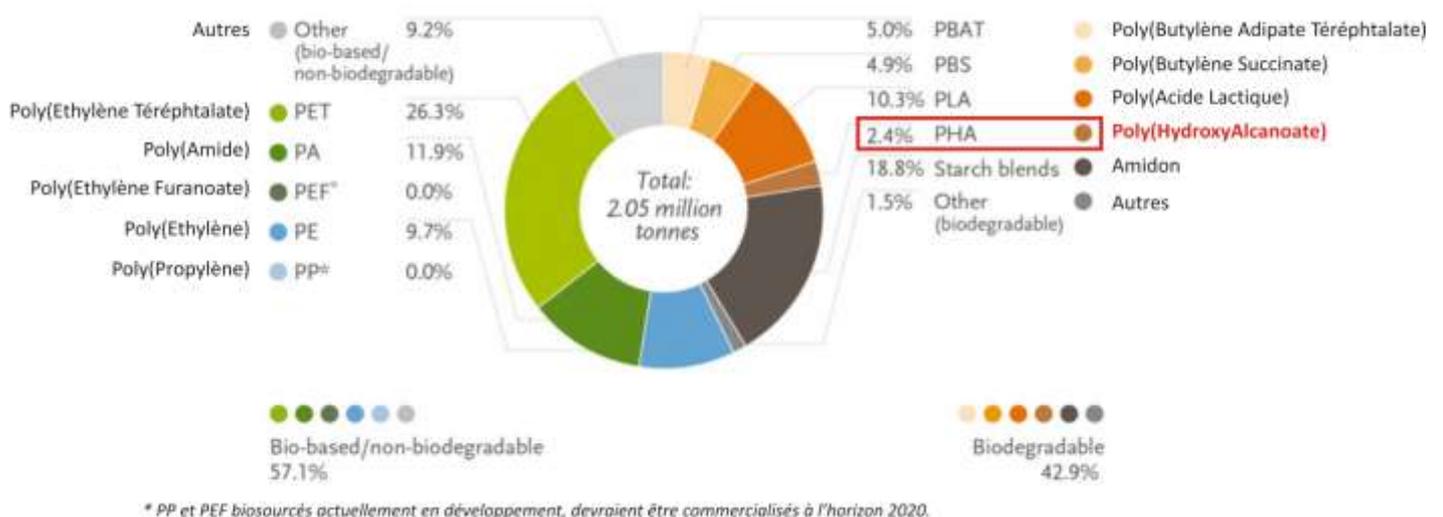
**Figure 11.** Classification des bioplastiques issus de ressources renouvelables.

En effet, même si les mélanges d'amidon, les PLA ou les PHA possèdent ces deux caractéristiques, les matériaux biosourcés ne sont pas nécessairement biodégradables. De la même manière, les polymères biodégradables ne sont pas forcément biosourcés, comme la Poly( $\epsilon$ -CaproLactone) (PCL) (Labet and Thielemans, 2009) et le polyester aromatique Poly(Butylène Adipate Téréphtalate) (PBAT) (Weng *et al.*, 2013) préparés à partir de

ressources fossiles *via* des procédés pétrochimiques (Avérous, 2004; Kumar and Thakur, 2017). Par définition, les plastiques **biodégradables** sont décomposés par la biomasse d'origine bactérienne, fongique, végétale ou animale, sous forme de CO<sub>2</sub> et d'eau en condition aérobie, ou en CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> et eau en milieu anaérobie, sans rejet de molécules toxiques dans l'environnement (Amass *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 2008). Un matériau biodégradable ne doit par ailleurs pas être confondu avec un polymère **compostable**. En effet, le compostage est la mise en œuvre optimisée et contrôlée du processus de conversion et de valorisation d'un matériau en produit stabilisé et hygiénique, obtenu en conditions de compost (humidité relative, température et oxygénation). Ainsi, un plastique compostable doit présenter un taux de biodégradation supérieur à 90% au bout de six mois de compostage, se désintégrer en fragments de taille inférieure à 2 mm et être faiblement concentré en métaux lourds (écotoxicité limitée).

### I. 3. 1. Implantation des PHA sur le marché

En matière de marché mondiale, les PHA représentaient en 2017 un total de 2,4% de la production de polymères biodégradables, et près de 7,6% de la part des biopolymères biosourcés biodégradables (**Figure 12**). Cependant, même si les PHA commencent à se distinguer aux côtés des matériaux biodégradables les plus utilisés tels que les mélanges d'amidon ou les acides poly(lactiques), ils n'occupent encore qu'une petite niche au sein du marché international.



**Figure 12.** Capacités de production mondiale des bioplastiques en 2017.  
D'après European Bioplastics - Nova Institute.

Cette troisième position au rang des polymères biosourcés et biodégradables les plus produits à ce jour peut s'expliquer par le coût de fabrication des PHA, plus élevé que celui des polymères synthétiques de grand usage (Doi *et al.*, 1995; Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004) (1,2 United States Dollars/kg pour le polypropylène versus 2,6 USD/kg pour le P(3HB) (Chen, 2009), mais également supérieur à celui de leurs concurrents (1,6 USD/kg pour le PLA et 2 USD/kg pour les polymères à base d'amidon) (Liu *et al.*, 2015).

Néanmoins, les PHA à courtes chaînes, PHA les plus produits à ce jour, possèdent des propriétés physiques et mécaniques comparables à celles des plastiques conventionnels, issus de l'industrie chimique (Tsuge, 2002; Elvers *et al.*, 2016). En effet, les PHA sont des matériaux **thermoplastiques, stables et résistants, insolubles** dans l'eau et **impermeables** à l'oxygène (Suriyamongkol *et al.*, 2007; Chidambarampadmavathy *et al.*, 2017).

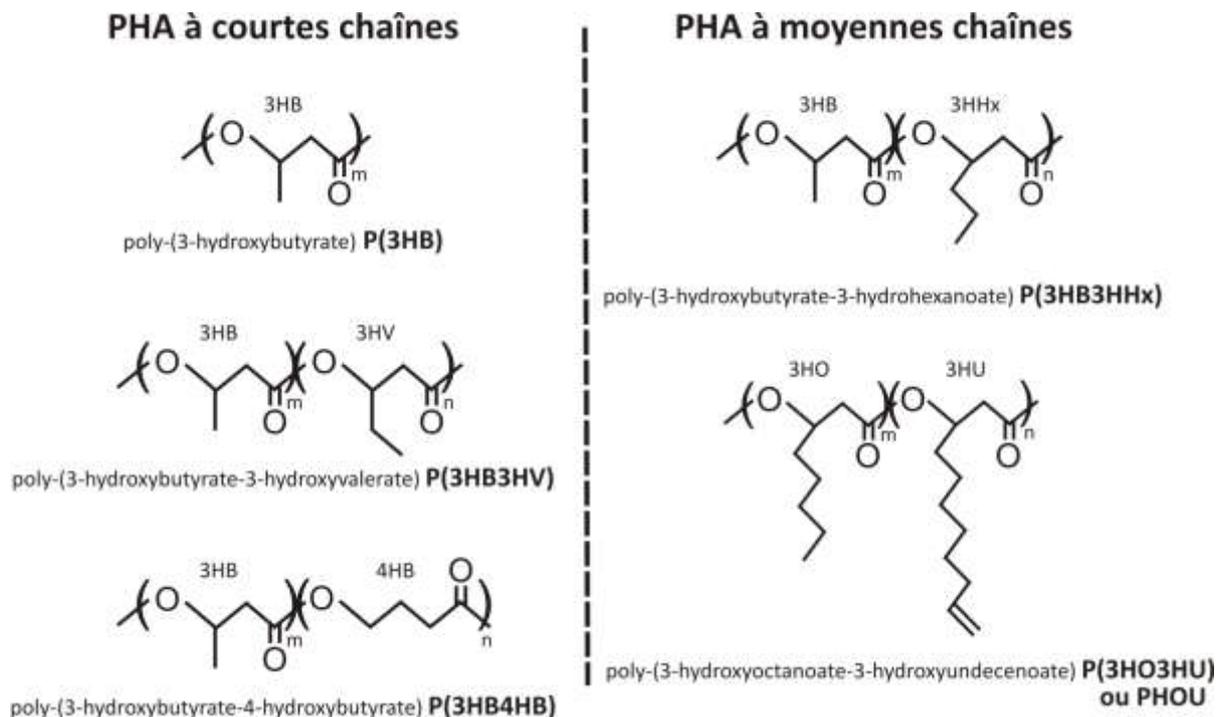
Ainsi, les PHA sont des biopolymères prometteurs, et font l'objet de nombreuses études dans des domaines d'application aussi variés que ceux de l'agriculture et de l'aquaculture, des biocarburants, des colles et adhésifs, des cosmétiques, des consommables, de l'emballage, de la papeterie ou encore des biocomposites (Avella *et al.*, 2000; Bordes *et al.*, 2009; Defoirdt *et al.*, 2011; Shantini *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2016).

Toutefois, au vu de leur coût de fabrication encore élevé, la large gamme de monomères exploitable et surtout leur biocompatibilité vis-à-vis de l'organisme humain, les PHA sont de plus en plus étudiés en tant que **matériaux à haute valeur ajoutée**, en particulier pour des applications associées à des domaines de pointe comme ceux du biomédical et de la pharmacologie (Sudesh *et al.*, 2000; Li and Loh, 2015; Butt *et al.*, 2018).

## I. 3. 2. Fonctionnalisation des PHA comme matériaux polyvalents

### I. 3. 2. 1. Fonctionnalisation de PHA par biosynthèse

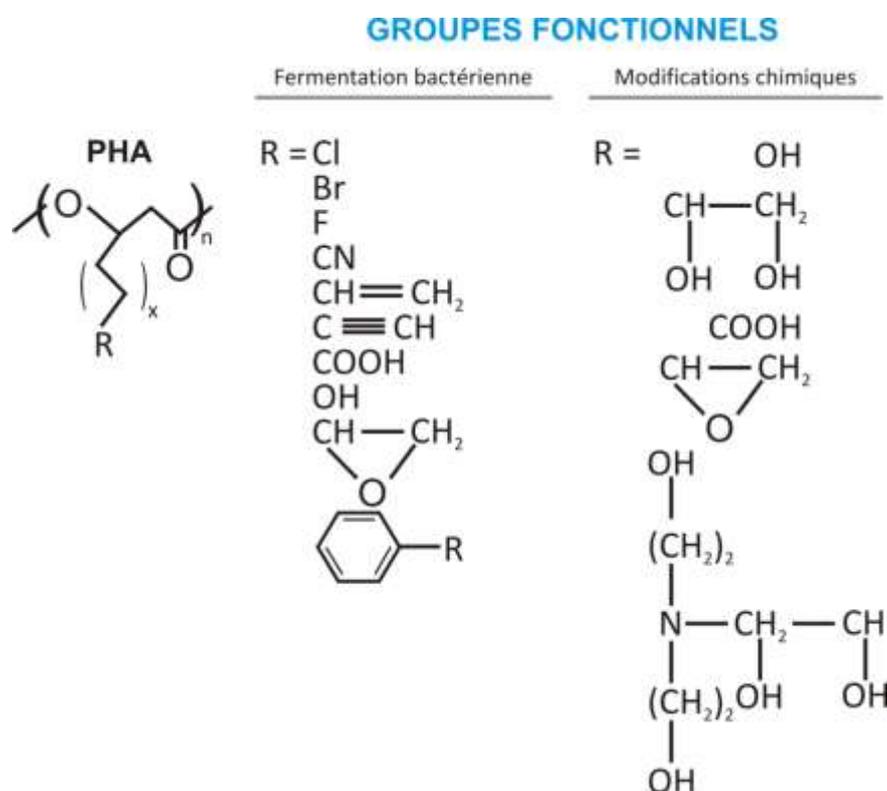
Aujourd'hui, plus de 150 motifs de monomères de PHA différents, portant une grande diversité de fonctions chimiques au niveau de leur **chaîne latérale** sont recensés dans la littérature (Steinbüchel and Valentin, 1995). Ces PHA sont synthétisés à partir de bactéries natives ou génétiquement modifiées, cultivées en présence de substrats originaux (acide valérique, 4-hydroxybutyrate, acide undécénoïque etc.), comme les PHA à courtes chaînes de type P(3HB3HV) (Zinn *et al.*, 2003), P(3HB4HB) (Le Meur *et al.*, 2014), ou encore les PHA constitués simultanément de courtes et de moyennes chaînes P(3HB3HHx) (Doi *et al.*, 1995; Qu *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009), P(3HV3HO) (Kang *et al.*, 2001) ou P(3HP4HB) (Meng *et al.*, 2012) (**Figure 13**).



**Figure 13.** Structure générale de PHA à courtes et moyennes chaînes.

Les structures de PHA les plus complexes, obtenues par **fermentation bactérienne**, ont été majoritairement initiées à partir de souches appartenant au genre *Pseudomonas*, capables de synthétiser des PHAmCl (Timm and Steinbüchel, 1990; Huijberts *et al.*, 1992; Lenz *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 2000). Ainsi, l'emploi de substrats à longue chaîne carbonée de type acide hexanoïque ou acide octanoïque portant des fonctions variées comme le brome (Kim *et al.*, 1992), le chlore (Doi *et al.*, 1995), le fluor (Kim *et al.*, 1996), des amines (Lenz *et al.*, 1992), des groupes hydroxyles (Kim *et al.*, 1992), des époxydes (Bear *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 2001), des phényles (Fritzsche *et al.*, 1990; Tobin and O'Connor, 2005) ou des carboxyles (Scholz *et al.*, 1994) a permis la synthèse de nouveaux monomères de PHA (**Figure 14**).

D'autre part, la synthèse bactérienne de PHA à moyennes chaînes possédant des **double** ou **triple liaisons** en position terminale sur les chaînes latérales comme le P(3HO3HU), a fait l'objet de nombreux travaux (Lageveen *et al.*, 1988; Gross *et al.*, 1989; Huijberts *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1995, 1997, 1998). Ces PHA sont intéressants car ils sont généralement produits en grande quantité par fermentation bactérienne, et sont aisément **fonctionnalisables** post-polymérisation de par la forte réactivité de l'insaturation terminale.



**Figure 14.** Structures moléculaires de PHA fonctionnalisés obtenus par fermentation bactérienne ou par modifications chimiques.

### I. 3. 2. 2. Fonctionnalisation de PHA par modification chimique

La biosynthèse de PHA permet la production de polymères originaux, néanmoins ces matériaux peuvent présenter des limites en matière de fonctionnalités et de propriétés physico-chimiques (Kai and Loh, 2014; Raza *et al.*, 2018). C'est la raison pour laquelle des techniques de modification chimique par hydroxylation, époxydation ou carboxylation ont été développées (Hazer and Steinbüchel, 2007). Ces synthèses ont principalement été réalisées à partir de PHAmcl comptant des insaturations tel que le P(3HO3HU) ; les PHAscl ne portant pas de sites fonctionnels réactifs exploitables sur leur chaîne latérale.

La conversion partielle ou totale de groupements vinyles terminaux en groupes hydroxyles (**hydroxylation**) à partir de P(3HO<sub>(75)</sub>3HU<sub>(25)</sub>) a été démontrée par Renard *et al.* (2005), pour générer des polymères amphiphiles solubles dans des solvants tels que le méthanol ou l'éthanol, sans diminution de masse molaire des polymères. Selon une méthode similaire, l'hydroxylation totale d'un P(3HU) a également été mise au point afin d'augmenter l'hydrophilie du polymère dans des solvants polaires (Eroğlu *et al.*, 2005). En outre, Lee *et al.* (2000) ont décrit la conversion d'insaturations de P(3HO<sub>(7)</sub>3HU<sub>(93)</sub>) à un taux maximal de 60% en groupements diols, taux suffisant pour la synthèse de PHA solubles dans le méthanol, le DMSO ou encore dans des mélanges 80/20 (v/v) acétone/eau.

Parallèlement à la production de PHAmcl époxydés par bioconversion, l'**époxydation** quantitative de P(3HO3HU) a été menée sans réaction secondaire ou diminution de masse molaire par Bear *et al.* (1997) et Park *et al.* (1998). Par ailleurs, des PHA portant des fonctions cationiques d'intérêt biomédical ont également été synthétisés à partir de PHA époxydés, pour former un polymère de poly(3-hydroxyoctanoate-3-hydroxy-11-(bis(2-hydroxyéthyl)amino)-10- hydroxyundecanoate)), complètement hydrosoluble et protonable à pH physiologique (Sparks and Scholz, 2008, 2009; Scholz, 2010).

D'autre part, la conversion d'insaturations terminales de P(3HO3HU) en groupements carboxyles (**carboxylation**) a été pour la première fois rapportée par Lee and Park (2000), selon une technique d'oxydation dérivée de la synthèse de diols, en présence de permanganate de potassium (KMnO<sub>4</sub>). Cette méthode n'a néanmoins permis la conversion

que de la moitié des doubles liaisons disponibles, et surtout une diminution drastique (86%) de la masse molaire du P(3HO3HU). De nouvelles méthodes de carboxylation de P(3HO3HU) par oxydation, utilisant différents réactifs, ont été développées par Bear *et al.* (2001), Kurth *et al.* (2002), Stigers and Tew (2003) et Renard *et al.* (2003). Des polymères totalement fonctionnalisés et non dégradés ont alors été obtenus.

### I. 3. 2. 3. Fonctionnalisation de PHA par greffage de polymères biocompatibles

Comme évoqué précédemment, les **PHA à courtes chaînes** ne portent pas de site fonctionnel réactif sur leur chaîne latérale, toutefois des expériences menées sur du P(3HB) ou du P(3HB3HV) ont permis le **greffage de polymères biocompatibles** par voie radicalaire. Ainsi, des copolymères de P(3HB) greffés de poly(éthylène glycol) (PEG) ont été synthétisés par Zhijiang et Zhihong (2007, 2011), à partir de P(3HB) et de PEG à groupe acrylate terminal par voie radicalaire, pour le développement de nouveaux matériaux composites pour des applications agricoles.

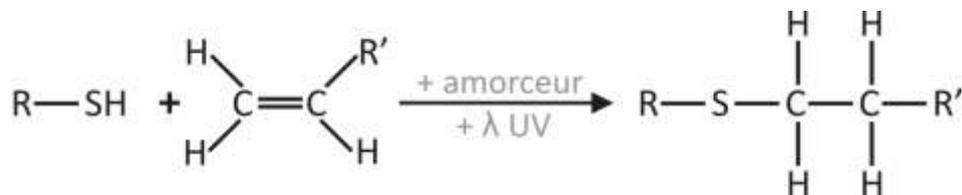
D'autre part, des polymères de poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) (PHEMA) ont été greffés à la surface de films de P(3HB3HV), afin de générer des matériaux aux propriétés de surface modifiées, tout en préservant les propriétés mécaniques d'origine (Lao *et al.*, 2007, 2010, 2011). Différentes méthodes de polymérisation ont été employées, par réaction radicalaire amorcée par voie thermique, ou par transfert d'atomes, ou par irradiation aux rayons ultraviolets, en fonction du taux de greffage recherché. A partir de films de P(3HB3HV), le greffage contrôlé d'oligomères de méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) et d'acide méthacrylique (MAA) a été développé par photochimie par Versace *et al.* (2012), pour la conception de systèmes adaptés au domaine biomédical.

Concernant les **PHA à moyennes chaînes**, le développement de matériaux fonctionnalisés par des polymères biocompatibles a principalement été mené sur des PHA portant des insaturations réactives terminales, tel le P(3HO3HU). Ainsi, des copolymères de PHA greffés de poly(éthylène glycol) (PEG) ou d'acide poly(lactique) (PLA) ont été conçus, par

des méthodes d'oxydation puis d'estérification (Renard *et al.*, 2003; Domenek *et al.*, 2007). Enfin, des réseaux P(3HO3HU)/PEG ont été élaborés par irradiation à l'aide de rayons ultraviolets en présence du PHA et de PEG à groupe acrylate terminal (Chung *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

De meilleurs taux de conversion ont été rapportés par Babinot *et al.* (2012, 2013), où des chaînes fluorées et/ou de PEG ont été greffées sur les insaturations terminales d'un P(3HO3HU), permettant la synthèse de copolymères amphiphiles, ensuite formulés sous forme de particules de type polymersomes à visée thérapeutique. Ces modifications chimiques ont été réalisées par photoréaction thiol-ène.

La méthode de photoréaction thiol-ène a été décrite par Nilsson *et al.* (2008) en tant que réaction chimique prometteuse. Celle-ci s'effectue entre un groupement thiol (-SH) et un alcène ou double liaison carbone-carbone (C=C), en présence d'amorceurs thermiques ou photochimiques (**Figure 15**) (Sangermano *et al.*, 2007; Yagci *et al.*, 2010). La méthode de photoréaction thiol-ène est rapide, applicable aux polymères de masse molaire élevée, et efficace car elle ne produit pas de produits dérivés et garantit des hauts rendements de réaction (Hoyle and Bowman, 2010; Lowe, 2014).



**Figure 15.** Schéma de la réaction de type thiol-ène.

Ce procédé chimique rapide et reproductible a récemment permis la synthèse de PHA fonctionnalisés aux propriétés thermomécaniques et élastiques originales, à l'image de poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyundecenoate) P(3HB3HU) portant des groupements alcools, acides ou esters (Levine *et al.*; 2016). Enfin, Modjinou *et al.* (2015) ont décrit l'élaboration de PHA à courtes chaînes (P3HB3HV) amphiphiles et de PHA à moyennes chaînes (P3HO3HNe) hydrosolubles, fonctionnalisés à l'aide de groupements sulfonates (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) par réaction thiol-ène photoactivée.

### I. 3. 3. Usage des PHA à des fins biomédicales

Les PHA sont des polyesters **biocompatibles** et **non-toxiques**, c'est-à-dire qu'ils n'engendrent aucune interférence ni dégradation au contact de quelconque matériel biologique (Masood *et al.*, 2015). Plus précisément et s'agissant du domaine animal, la biocompatibilité des PHA indique que ceux-ci ne provoquent pas de réaction de rejet de la part du système immunitaire de l'hôte, qu'ils soient ingérés ou adsorbés (Ali and Jamil, 2016).

Ainsi, les PHA sont qualifiés de **biomatériaux**, et font aujourd'hui l'objet de nombreux prototypes dans les domaines médicaux et pharmaceutiques. Selon l'application biomédicale et les propriétés du matériau envisagées, la catégorie ou le type de PHA idéal est sélectionné en fonction des caractéristiques physico-chimiques propres à celui-ci (**Tableau 01**). Communément, les **PHA à moyennes chaînes** comme le poly(3-hydroxyoctanoate) P(3HO) ou le poly(3-hydroxyoctanoate-3-hydroxyundecenoate) P(3HO3HU) sont des élastomères semi-cristallins et flexibles, caractérisés par une faible température de fusion et peu de résistance à la traction (Hazer *et al.*, 2010; Brigham and Sinskey, 2012).

**Tableau 01.** Propriétés thermiques et mécaniques des P(3HB), P(3HB3HV), P(3HB4HB), P(3HB3HHx) et P(3HO3HHx).

PHA	Température de fusion (°C)	Température transition vitreuse (°C)	Résistance à la traction (MPa)	Module de Young (GPa)	Allongement à la rupture (%)
P(3HB)	175	10	40	5,50	4,5
P(3HB <sub>(75)</sub> 3HV <sub>(25)</sub> )	137	-6	30	0,70	50
P(3HB <sub>(84)</sub> 4HB <sub>(16)</sub> )	152	-7	26	0,02	444
P(3HB <sub>(88)</sub> 3HHx <sub>(12)</sub> )	127	-1	4,5	0,14	108
P(3HO <sub>(75)</sub> 3HHx <sub>(25)</sub> )	59	-36	9	0,01	380

A l'inverse, les homopolymères de **PHA à courtes chaînes**, plus cristallins, ont quant à eux des températures de fusion élevées, proches des températures de dégradation, ainsi que des propriétés élastiques réduites, à l'image du P(3HB). Néanmoins, certains

**copolymères** de PHAscl, c'est-à-dire des polymères constitués de deux ou plusieurs motifs de monomères tels le poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) P(3HB3HV) ou le poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) P(3HB4HB), sont régulièrement préparés afin d'acquérir de nouvelles propriétés thermoplastiques et élastiques, et peuvent être employés comme biomatériaux (Chanprateep, 2010; Laycock *et al.*, 2013).

### I. 3. 3. 1. PHA, matériaux pour l'ingénierie tissulaire

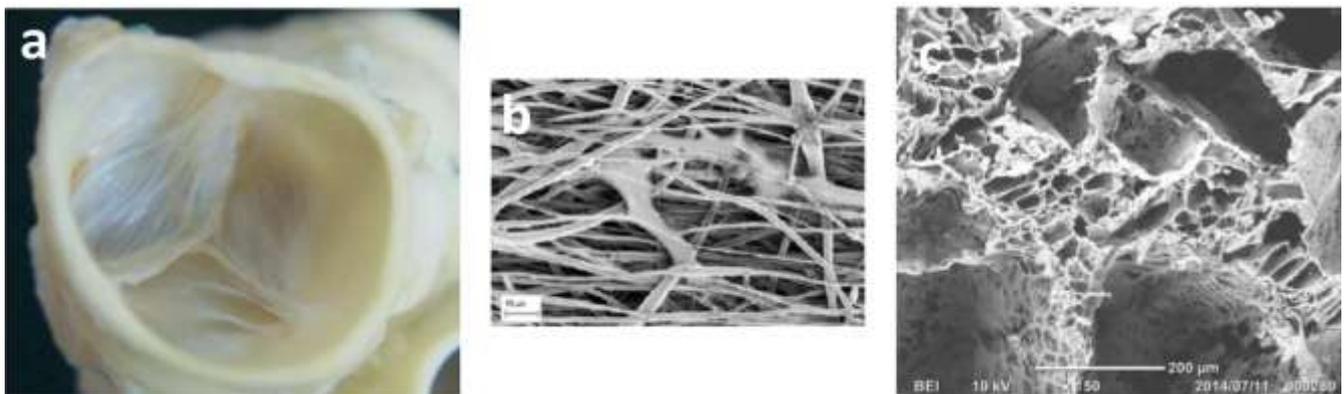
Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, les PHA ont été employés pour l'élaboration d'implants, de prothèses, de nanofibres ou autres support comme guide pour la croissance de tissus nerveux, osseux ou cartilagineux, à ce jour testés chez plusieurs mammifères (Chen and Wu, 2005; Masaeli *et al.*, 2013; Jana *et al.*, 2014; Ali and Jamil, 2016; Butt *et al.*, 2018). Sodian *et al.* (2000) ont implanté une **valve cardiaque** chez un agneau, constituée de copolymères flexibles de P(3HO), préalablementensemencée de cellules autologues (cellules provenant de l'organisme lui-même). Celle-ci est restée stable pendant près de trois mois sans développement de thrombose (caillot sanguin obstruant un vaisseau), présentant toutefois un léger phénomène de sténose (rétrécissement pathologique du diamètre d'un vaisseau).

La même valve cardiaque a été optimisée par ajout d'acide poly(glycolique) (PGA) au P(3HO3HHx), et s'est montrée parfaitement fonctionnelle six mois après implantation, sans formation de thrombose ni de sténose (Stock, Nagashima, *et al.*, 2000). D'autres études ont employé du P(3HB) imprégné à la surface d'une matrice tissulaire aortique de porc, pour la conception d'une valve cardiaque hybride résistante à la coagulation plasmatique et à la calcification (Stamm *et al.*, 2004) (**Figure 16a**). Hoerstrup *et al.* (2000) ont observé l'augmentation du volume de valves cardiaques composées de PGA et de P(4HB) implantées chez de jeunes agneaux, suivant leur croissance physiologique.

D'autre part, des **greffons vasculaires** poreux de P(4HB) ont été appliqués sur des artères pulmonaires de mouton, et une résorption quasi-totale du PHA ainsi qu'une formation de nouveau tissu cardiaque ont été observées après 169 jours de traitement

(Stock, Sakamoto, *et al.*, 2000). Enfin, des greffons poreux de mélanges de polymères de PGA-P(3HO3HHx) implantés durant cinq mois chez un agneau avec succès ont été soumis à des tests de traction et d'allongement. Ces analyses ont démontré des propriétés mécaniques du vaisseau greffé similaires à celles de vaisseaux natifs (Shum-Tim *et al.*, 1999).

Dans le domaine de la régénération des tissus nerveux, la conception de **conduits artificiels** biodégradables incarne une solution intéressante et alternative aux techniques de greffage de nerfs autologues par chirurgie. Des conduits de P(3HB) ont par ailleurs permis la reconstruction partielle d'un nerf sciatique de 10 mm de longueur chez le rat (Hazari *et al.*, 1999). Ces matériaux ont été optimisés par l'ensemencement sur leur surface de matrice extracellulaire, de cellules de Schwann et de facteurs de croissance (Mosahebi *et al.*, 2002, 2003; Armstrong *et al.*, 2007). D'autres types de supports constitués de P(3HB), P(3HB4HB), P(3HB3HV) ou de P(3HB3HHx) ont généré la prolifération et augmenté la survie de cellules nerveuses *in vitro*, encourageant ainsi l'emploi des PHA comme matériaux compatibles avec les fonctions biologiques inhérentes à la régénération de tissus aussi complexes que ceux appartenant au système nerveux (Novikov *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2010; Chen and Tong, 2012; Masaeli *et al.*, 2013; Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2015).



**Figure 16.** Exemples de biomatériaux conçus à base de PHA.

**a.** Valve cardiaque à base de P(3HB) (Stamm *et al.*, 2004). **b.** Image de nanofibres régénératives à base de P(3HB3HV) par MEB (Lemechko *et al.*, 2013). **c.** Image d'un support 3D de P(3HB3HU) par MEB (Levine *et al.*, 2015).

En matière de régénération osseuse, des **supports** composés principalement de PHA à courtes chaînes, de types P(3HB) ou P(3HB3HV), supplémentés en hydroxyapatite (HA)

issue du tissu osseux, ont présenté des résistances à la compression proches de celles des os humains (Galego *et al.*, 2000). De plus, ces mêmes matériaux ont engendré *in vivo* la prolifération concluante d'ostéoblastes et donc la régénération organisée des tissus, tout en prévenant tout phénomène d'inflammation chronique pendant plus d'un an (Cool *et al.*; Doyle *et al.*, 1991; Luklinska and Bonfield, 1997; Shishatskaya *et al.*, 2006). Plus récemment, des supports pour la régénération osseuse constitués de nanofibres de P(3HB), P(3HB4HB), P(3HB3HV) ou de P(3HB3HHx) ont été élaborés par méthode d'électrospinning, et ont démontré des potentiels prometteurs tant en matière de propriétés physico-mécaniques que de prolifération et différenciation cellulaire (Ricotti *et al.*, 2012; Lemechko *et al.*, 2013; Ramier, Boudierlique, *et al.*, 2014; Ramier, Grande, *et al.*, 2014; Volova *et al.*, 2014) (**Figure 16b**).

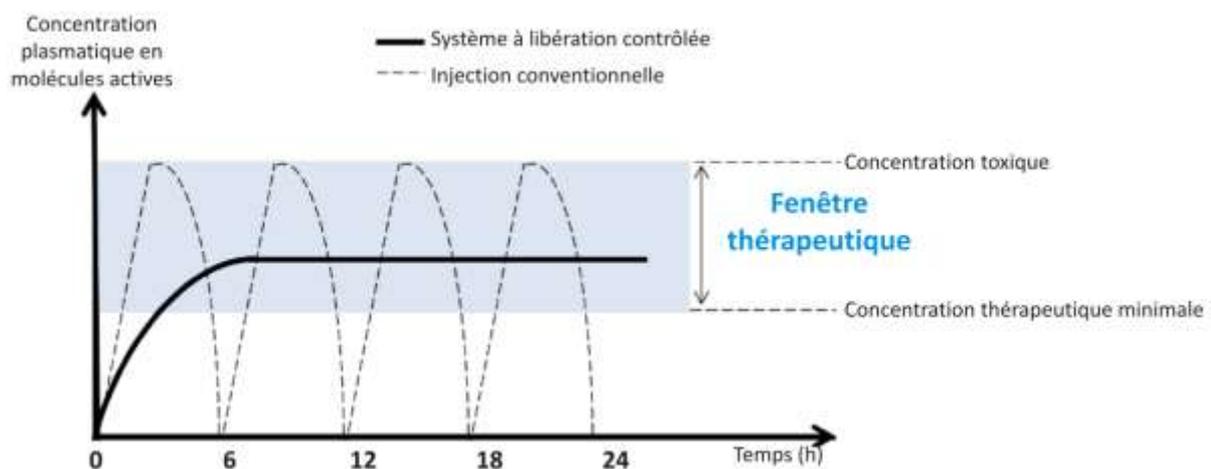
Quant à la réparation des tissus cartilagineux, dotés d'un faible pouvoir d'auto-guérison, induisant alors des problèmes d'arthrose et de perte de mobilité articulaire, des **structures 3D** de P(3HB), P(3HB3HV) ou de P(3HB3HHX) ont permis, *in vitro* et *in vivo*, la croissance soutenue de chondrocytes, et *a fortiori* la synthèse de nouveau cartilage en moins de quatre mois (Deng *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008, 2011; Levine *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015) (**Figure 16c**). Enfin, des supports à base de P(3HB) et de P(3HB3HV) ont également été employés avec succès, pour promouvoir l'adhérence et la prolifération de cellules de type fibroblaste, productrices de collagène et impliquées dans la régénération des ligaments et des tendons (Rathbone *et al.*, 2010).

### I. 3. 3. 2. PHA, matériaux pour la libération contrôlée de principes actifs

L'administration de molécules actives à visée thérapeutique est réalisée de manière directe, soit par injection, par ingestion ou par délivrance transdermique. Les principes médicamenteux naturels ou synthétiques sont ensuite distribués dans l'organisme en fonction de leurs caractéristiques et affinités physico-chimiques (polarité, masse molaire etc.). Or, l'efficacité de ces modes d'administration peut être limitée par la stabilité, la solubilité ou la toxicité des principes actifs.

Afin de proposer un mode d'administration compétitif et de diminuer les potentiels effets secondaires envers les tissus sains de l'organisme, la communauté scientifique s'intéresse à la **vectorisation**, ou la délivrance contrôlée et régulée de molécules thérapeutiques. La vectorisation permet non seulement de protéger le thérapeutique de la dégradation prématurée et du milieu environnant, mais également de maîtriser sa distribution en quantité suffisante au niveau des cellules ou tissus pathologiques cibles (Dellacherie *et al.*, 2001; Nigmatullin *et al.*, 2015; Li and Loh, 2016) (**Figure 17**).

L'emploi de PHA comme systèmes de libération thérapeutique contrôlée est testé à ce jour depuis plus de 20 ans, *in vitro* et *in vivo* sur les animaux (Pouton and Akhtar, 1996), sous forme d'implants ou de micro/nanoparticules. En effet, les PHA sont des polymères intéressants puisque outre leur caractère biodégradable et biocompatible, leurs produits de dégradation sont non toxiques et aisément éliminés par l'organisme.

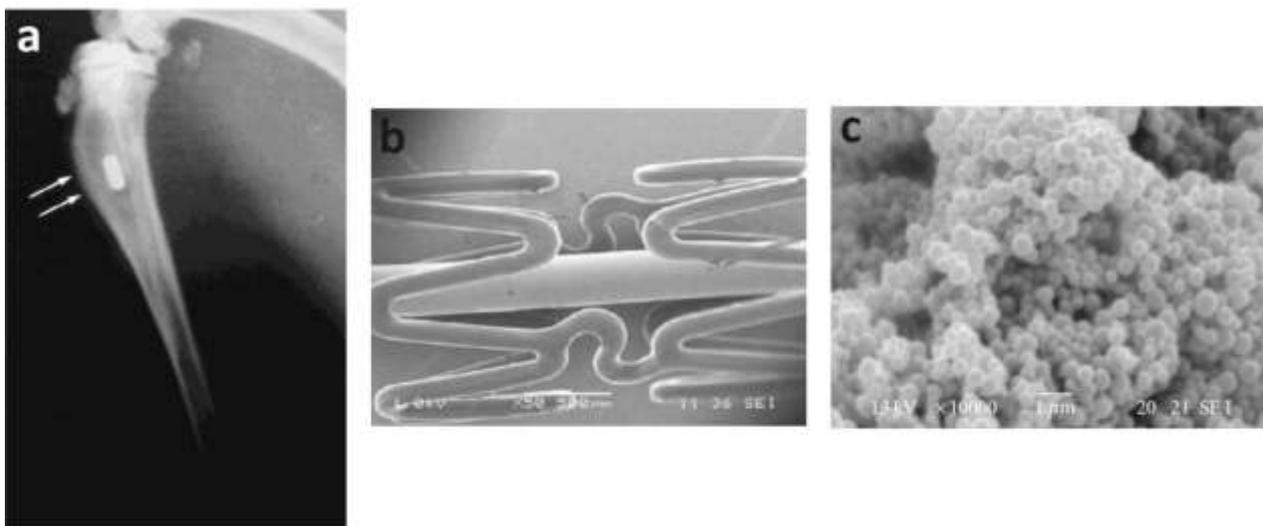


**Figure 17.** Evolution de la concentration en molécules actives au niveau du site d'action ciblé.

Des **implants** thérapeutiques à base de P(3HB3HV) (Yagmurlu *et al.*, 1999; Gürsel *et al.*, 2000; Türesin *et al.*, 2001) (**Figure 18a**), de P(3HO) (Vergnol *et al.*, 2012) (**Figure 18b**) ou de P(3HO3HHx) (Zhixiong Wang *et al.*, 2003) ont été conçus et/ou employés en tant que systèmes de délivrance de composés actifs de type analeptique (anti-prolifération cellulaire) ou antibiotique, par phénomène de diffusion dans l'organisme (Chen and Zhang, 2018). Le taux et la période de libération du thérapeutique sont globalement proportionnels à la

concentration en molécules actives présente au sein du matériau, et peuvent aisément être modulés (Zhioxiong Wang *et al.*, 2003).

D'autre part, les PHA ont également été développés comme vecteurs de molécules actives, encapsulées au sein de **micro** ou de **nanoparticules**. Des **microsphères** de P(3HB) et de P(3HB3HV) de diamètre égal à 5  $\mu\text{m}$ , chargées d'antibiotiques, ont été préparées par Kassab *et al.* (1997, 1999), Sendil *et al.* (1999) et Errico *et al.* (2009) (**Figure 18c**) par technique d'émulsion-évaporation. La vitesse de libération du principe actif s'est avérée extrêmement rapide, avec près 90% de molécules relarguées en 24 h.



**Figure 18.** Exemples de biomatériaux conçus à base de PHA.

**a.** Implant antibiotique à base de P(3HB3HV) (Yagmurlu *et al.*, 1999). **b.** Image d'un stent vasculaire enrobé de P(3HO) par MEB (Vergnol *et al.*, 2012). **c.** Image de microparticules de P(3HB) par MEB (Errico *et al.*, 2009).

Dans l'optique de ralentir la cinétique de relargage du principe actif, des microsphères composites de P(3HB3HV)/wollastonite encapsulant un antibiotique ont été synthétisées (Li and Chang, 2005). De part cette nouvelle composition, la diffusion du thérapeutique dans du tampon salin phosphate physiologique a été fortement diminuée, avec 90% de délivrance au bout de 22 jours. Des résultats similaires ont par ailleurs été obtenus avec la conception de microsphères de P(3HB3HV)/hydroxyapatite (HA) (Huang *et al.*, 2009).

A plus petite échelle, l'emploi de **nanoparticules** pour l'encapsulation et la délivrance de principes actifs présente de nombreux avantages (Soppimath *et al.*, 2001; Brannon-Peppas and Blanchette, 2012). En effet, leur taille nanométrique leur confère des propriétés pertinentes telles qu'une grande surface d'échange spécifique et une meilleure stabilité, ainsi que des capacités à esquiver les cellules phagocytaires du système immunitaire (furtivité). Ainsi, des nanoparticules de P(3HB3HV) (Baran *et al.*, 2002; Poletto *et al.*, 2008; Masood *et al.*, 2013; Eke *et al.*, 2014), de P(3HB4HB) (Murueva *et al.*, 2013) ou de P(3HO)-COOH (Kurth *et al.*, 2002; Renard *et al.*, 2010) ont été préparées afin de proposer des systèmes de délivrance performants.

Récemment, des nanoparticules constituées de mélanges de PHA et de PEG ont été élaborées de manière à augmenter la **furtivité** de ces nanovecteurs. En effet, il a été démontré que le PEG de masse molaire inférieure à 5000 g/mol, et plus particulièrement de 2000 g/mol, greffés et/ou imprégnés à la surface de nanovecteurs avaient une certaine capacité à échapper au système immunitaire, en se faisant repérer et donc internaliser moins rapidement par les cellules phagocytaires (Gref *et al.*, 2000; Amoozgar and Yeo, 2012; Giménez-Marqués *et al.*, 2018).

Ainsi, un certain nombre de nanoparticules hybrides de type P(3HB)/PEG (Chen *et al.*, 2006), P(3HB3HV)/PEG (Shah *et al.*, 2011), P(3HV4HB)/PEG (Shah *et al.*, 2010, 2012), P(3HB3HHx)/PEG (Lu *et al.*, 2014) et P(3HO3HU)/PEG (Babinot *et al.*, 2013) ont été conçues dans l'optique d'augmenter le temps de circulation de ces vecteurs thérapeutiques dans le sang, et de rejoindre et traiter les cellules et tissus pathologiques cibles sans capture prématurée par les cellules immunitaires, phagocytaires.

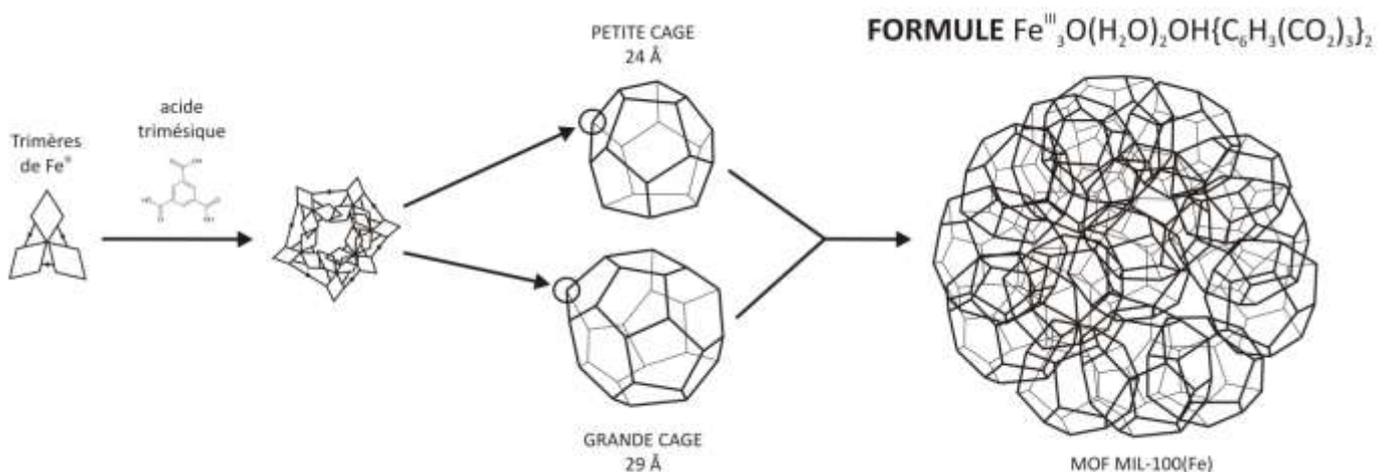
### I. 3. 4. MOF & nanoparticules hybrides

De nombreux types de nanoparticules poreuses à visée thérapeutique ont été développés, à partir de polyesters biodégradables et de polymères biocompatibles. Parallèlement, de nouveaux systèmes de vectorisation ont récemment montré des

potentialités accrues en matière d'encapsulation et de délivrance de principes actifs, appartenant à la famille des Metal-Organic Frameworks (MOF).

Les **Metal-Organic Frameworks (MOF)**, découverts en 1989 par Hoskins et Robson, représentent l'une des dernières classes de particules solides poreuses mises en évidence, impliquées dans des domaines aussi variés que ceux du stockage de gaz (Rowsell and Yaghi, 2005; Dincă and Long, 2008), de la séparation (Kurmoo, 2009), de la catalyse (Lee *et al.*, 2009) ou de la détection chimique (Xie *et al.*, 2010). Les MOF sont des structures hybrides hautement poreuses, constituées d'ions **métalliques** (Zn, Cr, Cu etc.) associés à des **ligands organiques** de types carboxylate, phosphonate, sulfonate ou autres, dont il existe à ce jour une large diversité en matière de taille et forme de pores (Férey *et al.*, 2005; Perry *et al.*, 2009).

Plus récemment, des MOF de taille nanométrique fer(III) polycarboxylate ont démontré des propriétés prometteuses pour des applications à visée biomédicale (Horcajada *et al.*, 2010; C. He *et al.*, 2015; Wu and Yang, 2017). En effet, ces MOF sont capables d'adsorber des quantités importantes de molécules actives de toute nature, comprises entre 20 et 70 wt%, de par le volume et la surface élevés qu'offrent leurs multiples pores amphiphiles (Horcajada *et al.*, 2008; Chalati *et al.*, 2011; Agostoni, Chalati, *et al.*, 2013). Parmi eux, les MOF fer(III) trimesate **MIL-100(Fe)** (MIL pour 'Material of Institut Lavoisier') sont des nanovecteurs thérapeutiques ayant fait l'objet de nombreuses études, synthétisés par micro-ondes couplés à une technique hydrothermale rapide et non toxique (Agostoni *et al.*, 2015) (**Figure 19**).



**Figure 19.** Schéma de la structure d'un MOF MIL-100(Fe).

Les MOF MIL-100(Fe) se forment spontanément par coordination entre des trimères d'ion métallique de Fe<sup>III</sup> (FeCl<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) et le ligand organique acide trimésique (C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>), pour générer deux types de cages mésoporeuses de 29 et 24 Å. Ces cages sont accessibles par des pores pentagonaux (5,6 Å) ou hexagonaux (8,6 Å), au sein desquels les molécules actives sont rapidement adsorbées par **imprégnation** (Horcajada *et al.*, 2010) ; une méthode simple appliquée à de nombreux principes actifs tels des anticancéreux ou antiviraux, interagissant soit avec le ligand organique, soit avec le centre métallique de la nanoparticule, en fonction du degré d'hydrophilie considéré (Huxford *et al.*, 2010). En moyenne, les MOF MIL-100(Fe) atteignent des diamètres compris entre 100 et 300 nm, selon la taille de nanoparticule recherchée.

D'un point de vue biologique, la **biocompatibilité** des MOF *in vivo* a été démontrée avec succès dans le cadre d'études impliquant des souris ou des rats (Baati *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017). En outre, de nombreuses expériences *in vitro* ont confirmé l'absence de toxicité des MOF MIL-100(Fe) vis-à-vis de cellules phagocytaires de type macrophage à des concentrations administrées inférieures à 50 µg/mL, et une concentration inhibitrice médiane (IC<sub>50</sub>) égale à 300 µg/mL (Chalati *et al.*, 2011; Agostoni, Horcajada, *et al.*, 2013; Tamames-Tabar *et al.*, 2013; Grall *et al.*, 2015).

Depuis quelques années et de manière à élaborer des vecteurs thérapeutiques fiables et plus adaptés aux conditions physiologiques, des expériences de **recouvrement** de MOF à partir de molécules biocompatibles ont été réalisées, pour principalement augmenter la **stabilité** des nanoparticules au sein du système circulatoire. Ces stratégies d'enrobage permettent par ailleurs l'acquisition de propriétés de **furtivité**, de **ciblage** ou de **bioadhésion** par les MOF, sans compromettre les **capacités d'encapsulation et de délivrance** des molécules actives (Giménez-Marqués *et al.*, 2018).

Ainsi, par simple phénomène d'interactions électrostatiques entre la surface du MOF et l'agent de recouvrement, des oligomères de cyclodextrine (Agostoni *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017), de l'héparine (Bellido *et al.*), des polysaccharides de types acide hyaluronique (Cai *et al.*, 2017) et chitosan (Hidalgo *et al.*, 2017), des lipides (dioleil-phosphocholine) (Wuttke *et al.*, 2015) ou encore des polymères de poly(ε-caprolactone) (Filippousi *et al.*, 2016) ont été employés pour la conception de MOF hybrides. Ces stratégies

d'enrobage ont globalement permis de limiter les phénomènes d'agrégation des MOF en milieu physiologique, voire de diminuer la vitesse de délivrance des molécules actives encapsulées, sans toutefois prévenir de manière efficace l'internalisation rapide des nanoparticules par les cellules du système immunitaire.

Pour apporter un certain caractère furtif à ces MOF, des polymères de **poly(éthylène glycol)** hautement polaires et biocompatibles (Zalipsky, 1993; Alcantar *et al.*, 2000; Lutz, 2008) de masses molaires comprises entre 500 et plus de 5000 Da ont également fait l'objet d'expériences de recouvrement. En effet, le PEG utilisé comme agent d'enrobage permet de prévenir la dégradation prématurée des nanoparticules dans le sang par diminution de l'adhésion des protéines à la surface du MOF, mais également de diminuer la reconnaissance et la capture des nanoparticules par les cellules du foie, de la rate ou du système immunitaire (phénomène de furtivité) (Bocca *et al.*, 1998; Immordino *et al.*, 2006; X. He *et al.*, 2015).

La **PEGylation** des nanoparticules de type MOF est à ce jour réalisée à partir de procédés chimiques covalents (Gref *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2015; Zimpel *et al.*, 2016), et notamment par technique rapide impliquant une seule étape de réaction (Graftfast) (Mévellec *et al.*, 2007; Giménez-Marqués *et al.*, 2018), afin d'optimiser la stabilité et le temps de circulation sanguine des MOF et de fait, améliorer le pouvoir thérapeutique des molécules actives encapsulées. Toutefois, des ajustements de composition voire de nouvelles stratégies de recouvrement restent à être mis au point, de manière à obtenir un vecteur thérapeutique complètement furtif, stable plusieurs heures au sein du système circulatoire, et performant en matière d'encapsulation et de délivrance de molécules actives.

## I. 4. Conclusion

Les domaines de recherche et champs d'applications associés aux poly(hydroxycanoates) bactériens sont aujourd'hui multiples, et concernent des spécialités aussi diverses que celles de la biologie moléculaire, de la production par fermentation

cellulaire, de l'écologie microbienne, des modifications chimiques ou de la synthèse de biomatériaux.

En effet, les potentialités des bactéries issues d'écosystèmes marins profonds en matière de production de PHA sont encore largement inexplorées, tout comme leur appartenance phylogénétique et leur distribution géographique. D'autre part, les PHA sont des matériaux biodégradables et biocompatibles, dont il existe une grande variété de monomères, adaptés pour le développement d'applications dans les domaines biomédicaux et pharmaceutiques, et notamment pour la conception de nanoparticules poreuses pour la libération de principes actifs.

Dans l'optique d'élargir les connaissances fondamentales et appliquées sur les PHA, le LM2E et l'ICMPE se sont associés pour proposer le sujet de thèse intitulé 'Potentiels des Poly(HydroxyAlcanoates) PHA bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique'.



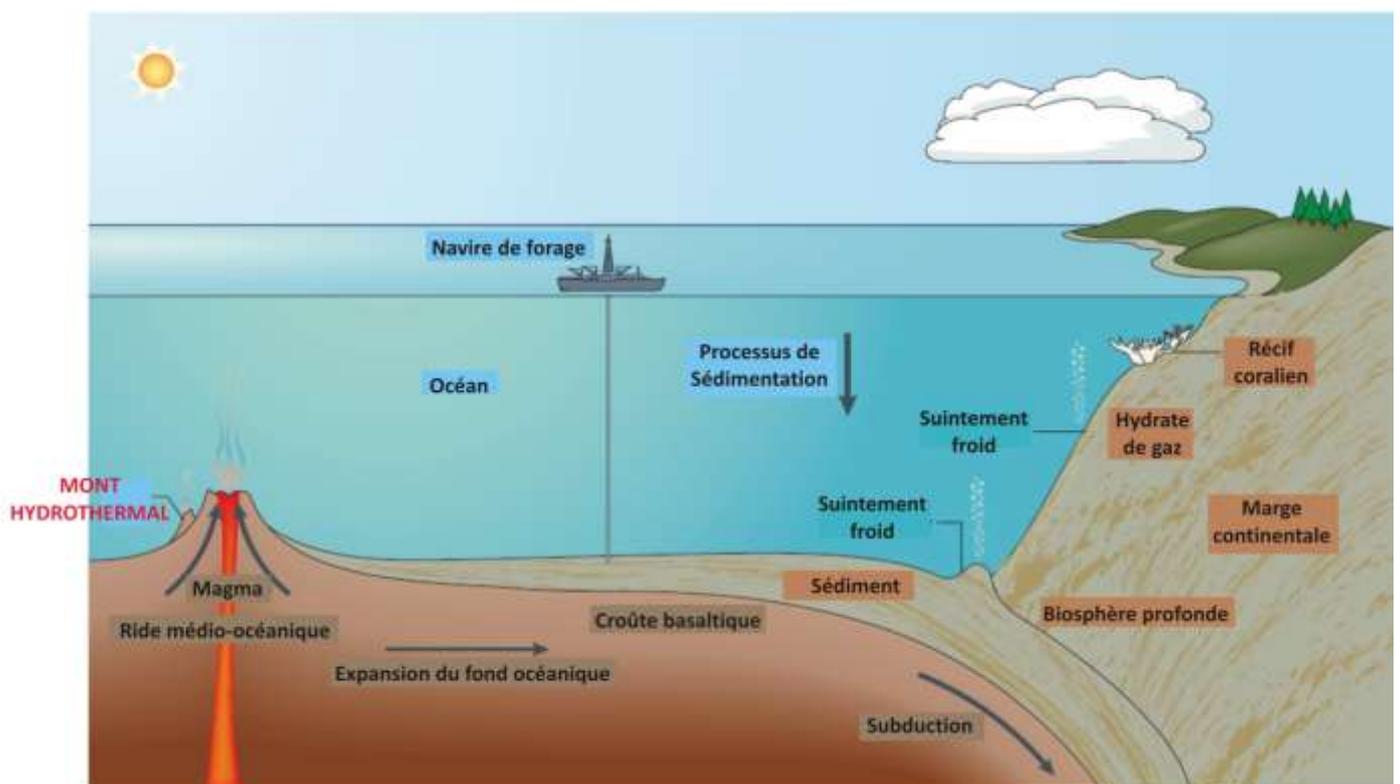
# CHAPITRE II

EXPLORATION DE LA BIODIVERSITE ASSOCIEE AUX  
ENVIRONNEMENTS MARINS PROFONDS POUR LA  
DETECTION DE BACTERIES PRODUCTRICES DE  
P(3HB4HB)



## II. 1. Introduction

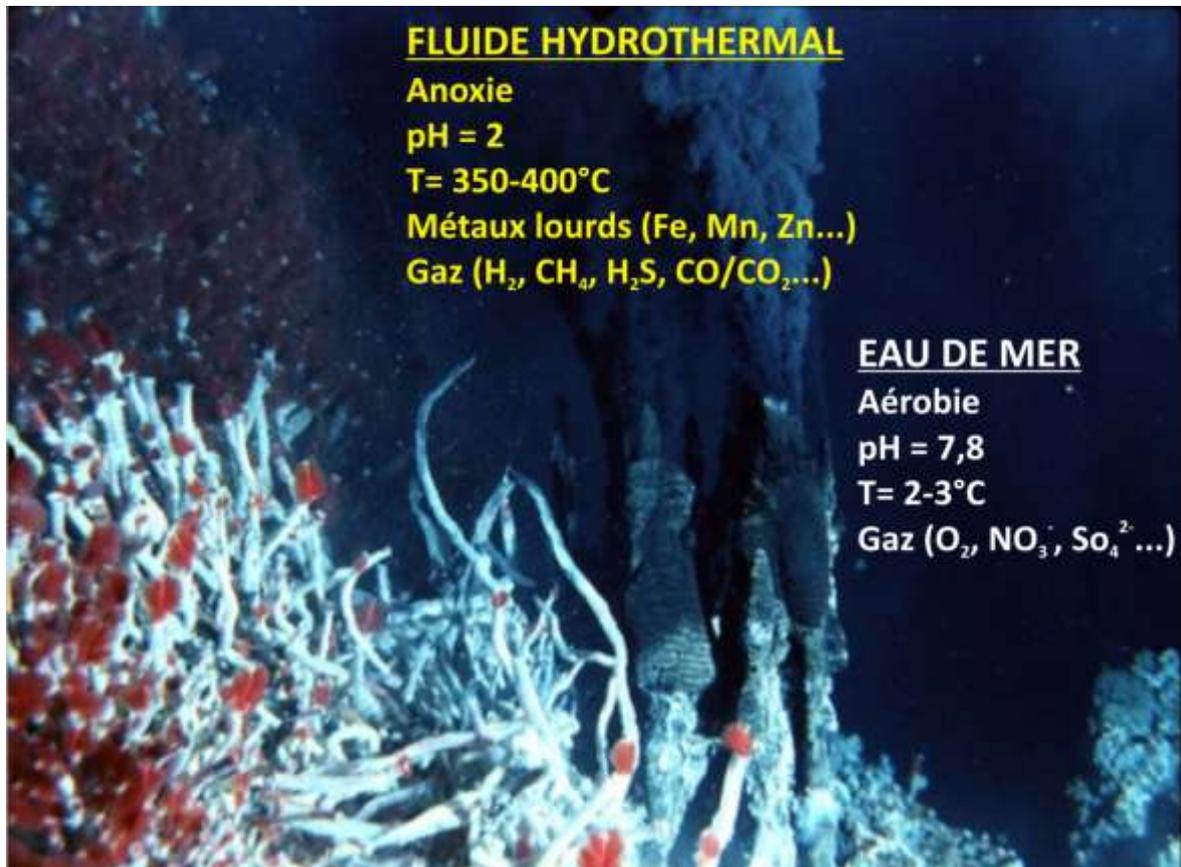
Depuis près de 40 ans, les développements technologiques ont permis l'exploration des mers et des océans, en particulier des écosystèmes marins profonds (Corliss *et al.*, 1978, 1979; Francheteau *et al.*, 1979, 1981). Parmi ces environnements, l'Ifremer s'intéresse plus précisément aux **cheminées hydrothermales** profondes situées au niveau des dorsales océaniques, dont la formation résulte des mouvements d'accrétion et d'extension des plaques tectoniques (Kelley *et al.*, 2001; Van Dover, 2014) (**Figure 20**).



**Figure 20.** Schéma des structures marines retrouvées à proximité d'une plaque tectonique.  
*D'après Jørgensen et Boetius, 2007.*

Globalement, l'eau de mer froide (2-3 °C) s'infiltré dans les multiples cavités de la croûte océanique et se réchauffe au contact de chambres magmatiques, dont la température avoisine les 1200 °C. Sous l'effet de la chaleur et de la pression, l'eau de mer remonte rapidement vers le plancher océanique en lessivant les roches environnantes. Le

**fluide hydrothermal** émis par ces cheminées est alors acide (pH = 2), chaud (350-400 °C), anoxique et chargé en gaz dissous (H<sub>2</sub>S, CH<sub>4</sub> etc.) et éléments métalliques (Fe, Mn, Zn etc.) (Jørgensen and Boetius, 2007; Jebbar *et al.*, 2015) (**Figure 21**).



**+ OBSCURITE + PRESSION = 30-110 Mpa**

**Figure 21.** Image d'une cheminée hydrothermale située au niveau de la ride Juan de Fuca dans l'océan Pacifique, et paramètres physico-chimiques associés.

*Photographie Ifremer.*

A l'interface entre les fluides hydrothermaux et l'eau de mer, cet environnement est qualifié d'**extrême** car soumis simultanément aux fortes pressions (30-110 MPa), aux gradients élevés de température, pH et concentrations en éléments toxiques, à l'absence de lumière et aux faibles apports détritiques des couches superficielles de l'océan. Malgré ces conditions hostiles, une vie foisonnante et une grande biodiversité s'est installée à proximité de ces écosystèmes, dont le fonctionnement repose sur les bactéries chimiosynthétiques, c'est-à-dire capables d'oxyder des molécules inorganiques (hydrogène, sulfure d'hydrogène)

pour créer l'énergie nécessaire à la conversion des molécules carbonées (dioxyde de carbone, méthane) en éléments nutritifs (Dubilier *et al.*, 2008; Jannasch, 2013). Les micro-organismes hydrothermaux (*Bacteria* et *Archaea*) constituent les **producteurs de la matière première** de ces écosystèmes, à la base du développement de nombreuses espèces animales, avec lesquelles des relations symbiotiques étroites ont été démontrées (Stewart *et al.*, 2005; Klose *et al.*, 2015; Le Bloa *et al.*, 2017).

Les études menées depuis près de 30 ans sur les micro-organismes colonisant les environnements hydrothermaux profonds ont révélé une diversité génomique exceptionnelle (Takai and Horikoshi, 1999; DeLong, 2005; Green Tringe *et al.*, 2005; Sogin *et al.*, 2006), expliquée par les **stratégies d'adaptation** développées par ces derniers pour survivre dans ces conditions extrêmes. Les micro-organismes adaptés à ces environnements marins profonds sont ainsi considérés comme des réservoirs de gènes fonctionnels, codant des voies métaboliques originales, à l'image des nombreuses espèces halophiles reconnues pour leur capacité de production de solutés compatibles ou de macromolécules (Oren, 2010; Quillaguamán *et al.*, 2010). Les micro-organismes marins, et plus particulièrement les bactéries, sont aujourd'hui des vecteurs de choix pour la production de biopolymères, et notamment de poly(hydroxyalcanoates) (Guezennec *et al.*, 1998; Chien *et al.*, 2007; Christelle Simon-Colin, Raguénès, Costa, *et al.*, 2008).

En parallèle, le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes étudie les micro-organismes issus des environnements marins extrêmes, et notamment des sources hydrothermales. En plus des activités de préparation et d'organisation de campagnes océanographiques, le LM2E a pour missions la description de la diversité microbienne phylogénétique et fonctionnelle, ainsi que la compréhension des processus adaptatifs bactériens, archaéens et viraux, aux niveaux cellulaire et moléculaire. C'est autour de ces thématiques de recherche que les objectifs concernant l'axe microbiologie de cette thèse ont été établis.

Ainsi, il s'agissait dans un premier temps d'élaborer une méthode de criblage moléculaire par technique PCR, pour la détection de bactéries marines productrices de PHA à courtes chaînes, et en particulier de copolymères de P(3HB4HB), d'intérêt biomédical. Ensuite, à partir des isolats bactériens issus de la collection Ifremer-LM2E et déterminés

positifs au criblage moléculaire, des expérimentations de fermentation standardisées et optimisées ont été réalisées afin d'induire la synthèse de copolymères de P(3HB4HB), à des rendements de production et des ratios d'unités 4HB les plus élevés possibles. Enfin, dans un dernier objectif d'exploration de la biodiversité bactérienne associée aux environnements marins profonds, des analyses taxonomiques et phylogénétiques portées sur les bactéries productrices de PHAscl ont été menées, afin d'enrichir nos connaissances sur la diversité des micro-organismes issus de ces écosystèmes.

## II. 2. Matériels & Méthodes

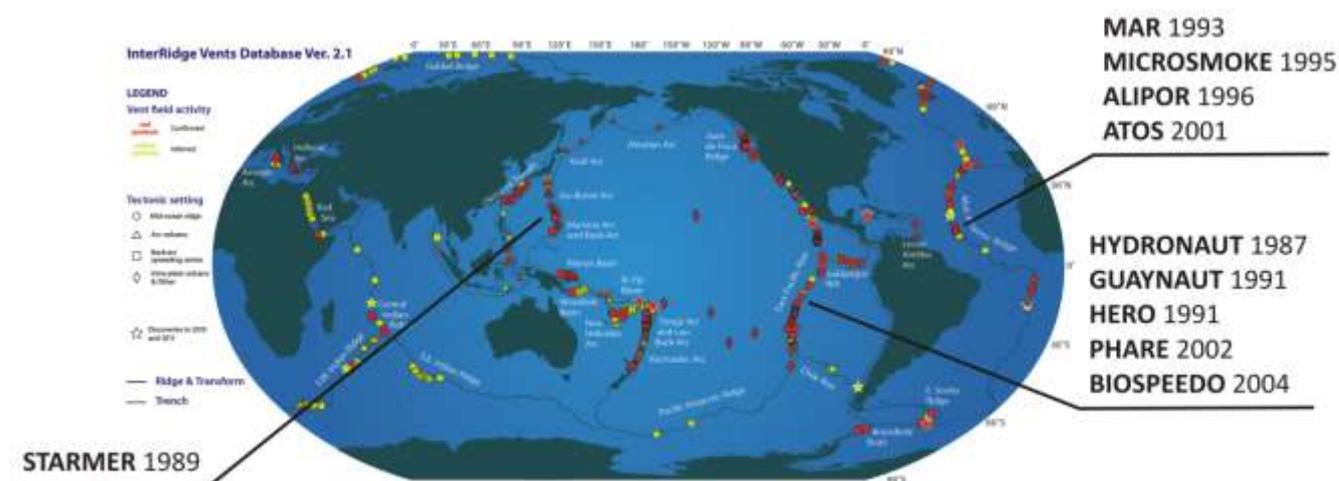
### II. 2. 1. Echantillonnage de la collection Ifremer-LM2E

Depuis 1987, de nombreuses campagnes océanographiques Ifremer ont été menées à proximité de monts hydrothermaux, tant dans l'océan Atlantique que Pacifique (**Figure 22**). Ces missions d'exploration de la diversité microbienne ont permis la collecte de fluides hydrothermaux, de fragments de cheminées, de sédiments, d'animaux invertébrés ou encore d'eau de mer à des profondeurs comprises entre 2000 et 6000 m (**Tableau 02**).

Ces échantillons marins profonds ont ensuite été incubés sur géloses nutritives non sélectives pour la prolifération de micro-organismes, suivant la technique de l'ensemencement par épuisement, de façon à obtenir des colonies microbiennes isolées. Cette méthode de sélection a permis de rassembler près de 1400 isolats, archéens et bactériens, aérobies et anaérobies, mésophiles et thermophiles, puis de les enregistrer et les stocker dans 15% de glycérol utilisé comme cryoprotectant, avant conservation à -80°C pour créer la **collection Ifremer-LM2E**.

Pour les besoins de ce travail de thèse, seules les **souches bactériennes aérobies et mésophiles** ont été sélectionnées, c'est-à-dire celles capables de croissance à taux d'oxygène et pression atmosphériques, et à températures comprises entre 20 et 40°C, autrement dit dans des conditions expérimentales aisées et compatibles avec la production de PHA à caractère exploratoire. Ainsi, **368 isolats**, pour la plupart sans affiliation

phylogénétique, ont intégré la base de données initiale pour débiter la première étape de détection de bactéries productrices de P(3HB4HB).



**Figure 22.** Noms, dates et zones géographiques des campagnes océanographiques Ifremer. Carte disponible sur le site <https://vents-data.interridge.org>.

**Tableau 02.** Noms des campagnes océanographiques Ifremer, dates, localisations, profondeurs d'échantillonnage et nombre de souches mésophiles aérobies collectées.

CAMPAGNE	DATE	LOCALISATION	PROFONDEUR	SOUCHES
HYDRONAUT	Novembre 1987	Est Pacifique	2600 m	17
STARMER	Juillet 1989	Sud Ouest Pacifique	2000 m	115
HERO	Octobre 1991	Nord Est Pacifique	2600 m	5
GUAYNAUT	Novembre 1991	Est Pacifique	2000 m	27
MAR	Mai 1993	Ride médio Atlantique	3500 m	14
MICROSMOKE	Novembre 1995	Ride médio Atlantique	3500 m	101
ALIPOR	Juillet 1996	Porcupine Atlantique	6000 m	1
ATOS	Juin 2001	Azores Atlantique	2300 m	35
PHARE	Mai 2002	Nord Est Pacifique	2600 m	2
BIOSPEEDO	Avril 2004	Sud Est Pacifique	2800 m	27

## II. 2. 2. Elaboration d'une collection de travail

A partir des 368 cryotubes stock conservés à -80°C, 800 µL de culture ont été ensemencés dans des tubes contenant 8 mL de milieu Zobell constitué de 20 g/L de Sea salts (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA), de 5 g/L de peptone et de 1 g/L d'extrait de levure (Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA), et dont le pH a été ajusté à 7,6 unités. Les tubes ont ensuite été incubés à 34°C sous agitation horizontale à 150 rpm. En parallèle, quelques microlitres des cryotubes stock ont été étalés sur géloses Zobell et incubés trois jours à 34°C, afin de vérifier la pureté des colonies bactériennes.

Au bout de 8 h, en fin de phase exponentielle de croissance, 1,5 mL de glycérol cryoprotectant stérile ont été ajoutés aux cultures, avant redistribution dans de nouveaux cryotubes pour élaborer une collection de travail. Malgré nos efforts, 24 isolats n'ont pu être remis en culture, menant à **344** le nombre de **souches bactériennes** à tester pour la capacité de production de copolymères de P(3HB4HB).

## II. 2. 3. Développement d'une méthode de criblage moléculaire pour la détection de bactéries productrices de P(3HB4HB)

Comme évoqué dans la revue bibliographique, un certain nombre de méthodes de criblage colorimétrique et moléculaire, permettant la détection de bactéries productrices de PHA, ont été décrites dans la littérature. Dans le cadre de cette thèse, le premier objectif visait à mettre au point une technique de criblage moléculaire par PCR, rapide et peu onéreuse, pour la détection de bactéries marines potentiellement productrices de PHA à courtes chaînes, et en particulier de type P(3HB4HB). Or à notre connaissance, tous les protocoles PCR, présentés précédemment, ont été conçus à partir de bactéries terrestres, donc peu adaptés aux isolats marins. Ainsi, la première tâche de ce travail de thèse a été de concevoir des amorces PCR, adaptées à la **diversité bactérienne marine**.

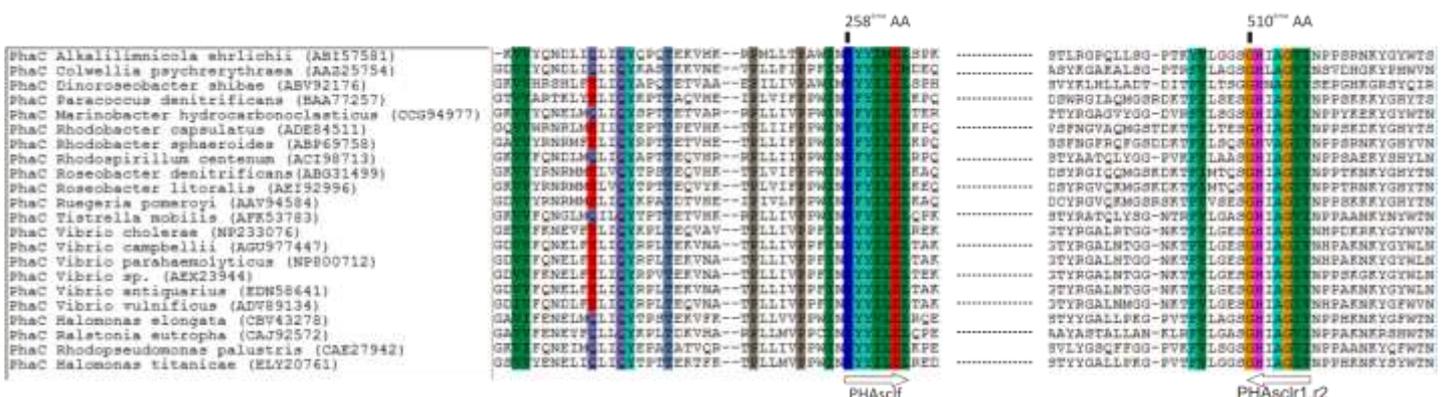
Deux catégories d'amorces PCR spécifiques ont ainsi été dessinées, pour initier l'amplification du gène codant la **PHA synthase de type I** (*phaC*) responsable de la polymérisation des unités monomériques de PHAscl ; la seconde pour amplifier le gène codant la **4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transférase** (*4HBCoAt*), impliquée dans la condensation du coenzyme A et du 4-hydroxybutyrate en 4-hydroxybutyryl-CoA, pris en charge par la même enzyme PhaC, pour initier la synthèse de P(3HB4HB).

## II. 2. 3. 1. Conception d'amorces PCR ciblant les gènes *phaC* et *4HBCoAt*

### II. 2. 3. 1. 1. Conception d'amorces PCR pour la détection du gène *phaC* de type I

La conception des amorces PCR codant la PHA synthase de type I a été réalisée en deux temps. Tout d'abord, les **séquences protéiques** correspondant à l'enzyme PhaC ont été recherchées dans la base de données NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Près de 22 séquences appartenant à des bactéries terrestres et marines ont été retenues, car toutes complètes, annotées et validées.

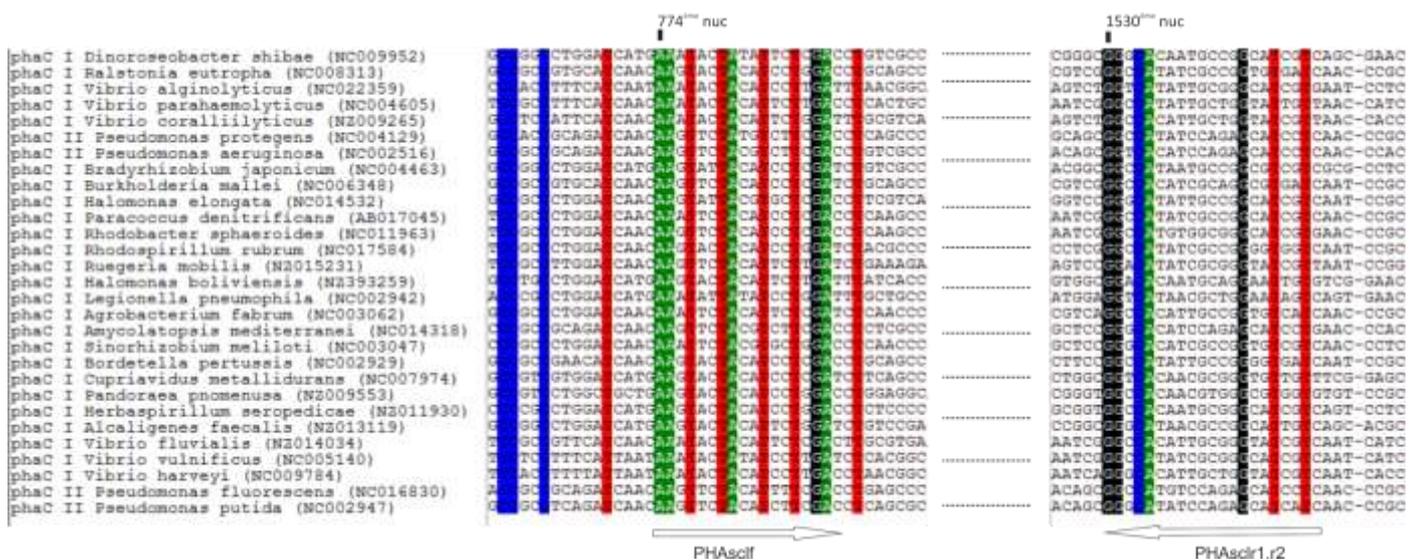
Seules des séquences issues de protéobactéries ont pu être recensées ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), et celles-ci ont ensuite été éditées dans le logiciel BioEdit version 7.2.5 (Hall, 1999) puis alignées grâce au programme MUSCLE EMBL (Edgar, 2004) (**Figure 23**).



**Figure 23.** Alignement des régions conservées des séquences protéiques codant la PHA synthase de type I (PhaC) (numéros d'accèsion GenBank entre parenthèses).

L'alignement de séquences a révélé deux régions conservées sur la protéine PhaC, comptant sept acides aminés chacune, qui ont été sélectionnées pour la conception d'amorces forward (sens) et reverse (anti-sens) : **K(Y/F)YILD** et **GHIAG(V/I)(V/I)**. Tel qu'indiqué sur la **Figure 23**, ces séquences sens et anti-sens débutent aux 258<sup>ème</sup> et 510<sup>ème</sup> acides aminés du gène *phaC* chez la souche référence *R. eutropha*.

Ensuite, chaque acide aminé des deux régions désignées a été traduit en triplet de nucléotides, en respectant les règles inhérentes au code génétique. Néanmoins, le code génétique étant universel mais redondant, plusieurs combinaisons de nucléotidiques peuvent correspondre à un seul acide aminé. Un second alignement a alors été effectué à partir de **séquences nucléotidiques** correspondant au gène *phaC*, afin de sélectionner les nucléotides les plus récurrents au sein de ces régions conservées. Par le même procédé, quelques 29 séquences complètes et validées, issues de protéobactéries terrestres et marines, ont été éditées puis alignées (**Figure 24**).



**Figure 24.** Alignement des régions conservées des séquences nucléotidiques relatives au gène *phaC* de type I (numéros d'accèsion *GenBank* entre parenthèses).

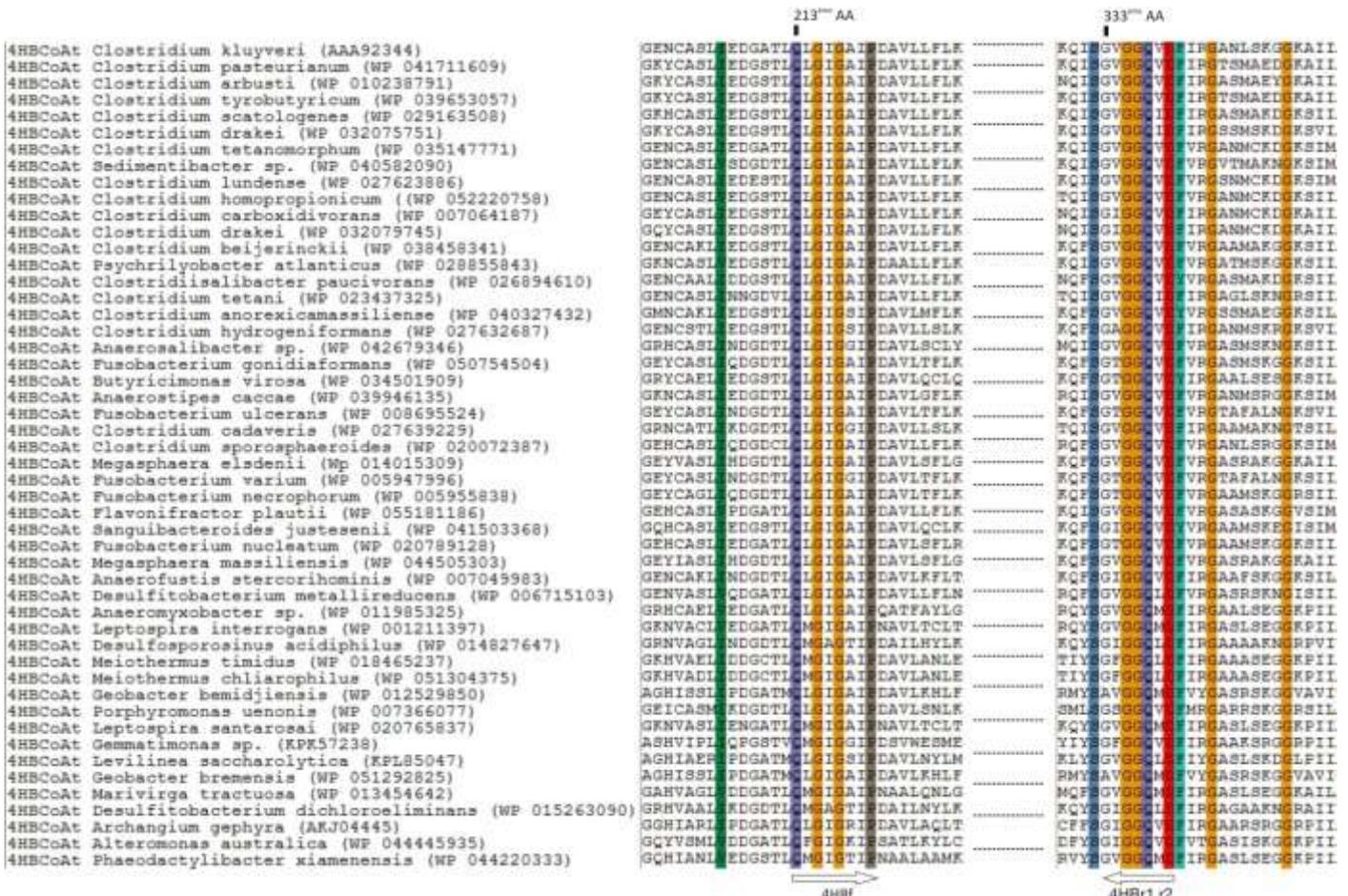
Ainsi, des amorces dégénérées correspondant aux régions conservées de la PHA synthase de type I et permettant l'amplification du gène *phaC* ont été dessinées, d'une longueur de 18 à 21 bases, en fonction des nucléotides les plus fréquemment retrouvés dans l'environnement. Les amorces PCR oligonucléotidiques ainsi développées **PHAsclf**, **PHAsclr1** et **PHAsclr2**, ont été commandées chez Eurogentec (Liège, Belgique) (**Tableau 03**).

**Tableau 03.** Séquences nucléotidiques des amorces PHAsclf, PHAsclr1 et PHAsclr2.

Nom primer	Séquence nucléotidique
PHAsclf	5'- AA(A/G) T(A/T)(C/T) TA(C/T) AT(A/C/T) (C/T)T(A/C/T/G) GA(C/T)-3'
PHAsclr1	5'-(A/C/T)AT (A/C/T/G)AC (A/C/T/G)CC (A/C/T/G)GC (A/C/T)AT (C/T)TG (A/C/T/G)CC-3'
PHAsclr2	5'-(A/C/T/G)AC (A/C/T)AT (A/C/T/G)CC (A/C/T/G)GC (A/C/T)AT (C/T)TG (A/C/T/G)CC-3'

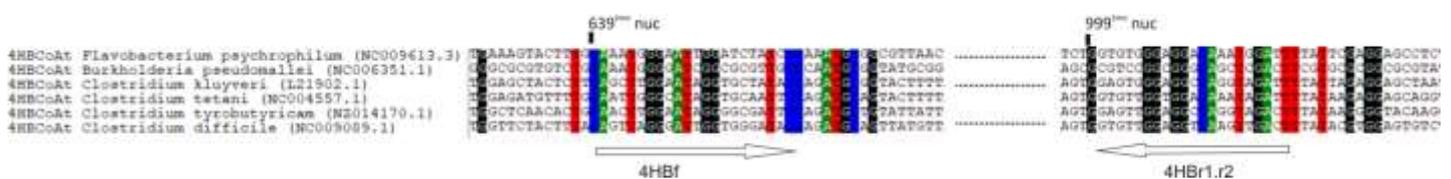
II. 2. 3. 1. 2. Conception d'amorces PCR pour la détection du gène *4HBCoAt*

En parallèle de la conception d'amorces PCR spécifiques du gène *phaC*, des amorces PCR destinées à amplifier le gène codant la 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transférase ont également été construites. Près de 73 **séquences protéiques** complètes, validées et annotées issues de la base de données NCBI et relatives à l'enzyme 4HBCoAt appartenant à 39 genres bactériens différents (terrestres et marins) ont été éditées et alignées (**Figure 25**).



**Figure 25.** Alignement des régions conservées des séquences protéiques codant la 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transférase (4HBCoAt) (numéros d'accension GenBank entre parenthèses).

Deux régions conservées ont été sélectionnées pour la conception d'amorces sens et anti-sens, également composées de sept acides aminés chacune : **Q(L/M)GIG(A/K)I** et **G(I/V)GGQ(M/V)D**. Ces séquences forward et reverse dessinées débutent respectivement aux 213<sup>ème</sup> et 333<sup>ème</sup> acides aminés du gène *4HBCoAt* chez la souche référence *C. Kluyveri*. Comme précédemment et tenant compte de la redondance du code génétique, des **séquences nucléotidiques** correspondant au gène *4HBCoAt* ont été recherchées dans la base de données NCBI, afin de sélectionner les alignements de nucléotides les plus fréquemment rencontrés au sein de ces régions conservées.



**Figure 26.** Alignement des régions conservées des séquences nucléotidiques du gène *4HBCoAt* (numéros d'accès entre parenthèses).

Finalement, seules six séquences relatives au gène d'intérêt étaient disponibles sur la plateforme, appartenant à trois genres bactériens (**Figure 26**). Ce faible panel de séquences n'a probablement pas permis d'obtenir une variabilité nucléotidique proche de la réalité. Par conséquent et à l'image des amorces PHAscl, il a été décidé de dégénérer les amorces 4HB, de manière à amplifier les gènes *4HBCoAt* chez un maximum de genres bactériens différents. Les amorces oligonucléotidiques **4HBf**, **4HB1** et **4HB2** construites pour l'amplification du gène codant la 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transferase, d'une longueur de 21 à 23 bases, ont été commandées chez Eurogentec (**Tableau 04**).

**Tableau 04.** Séquences nucléotidiques des amorces 4HBf, 4HB1 et 4HB2.

Nom primer	Séquence nucléotidique
<b>4HBf</b>	5'-CA(A/G) CT(A/C/T/G) GG(A/C/T/G) AT(A/C/T) GG(A/C/T/G) AA(A/G) AT(A/C/T) CC-3'
<b>4HB1</b>	5'-(A/G)TC (A/C/T/G)AT (C/T)TG (A/C/T/G)CC (A/C/T/G)CC (A/C/T/G)AC (A/C/T/G)CC-3'
<b>4HB2</b>	5'-(A/G)TC (A/C/T/G)AC (C/T)TG (A/C/T/G)CC (A/C/T/G)CC (A/T/G)AT (A/C/T/G)CC-3'

## II. 2. 3. 2. Mise au point d'un protocole de criblage moléculaire des gènes *phaC* et *4HBCoAt* par technique PCR

Le protocole d'extraction du matériel génétique et les paramètres relatifs à l'étape de PCR ont tout d'abord été mis au point sur deux souches déjà décrites au laboratoire. La première, *Halomonas profundus* AT1214, d'ores et déjà caractérisée comme productrice de PHAscl, a servi de témoin positif à l'étude (C. Simon-Colin *et al.*, 2008). A l'inverse, *Pseudomonas guezenei* RA26, produisant du PHAmcl, a été désignée comme témoin négatif (C. Simon-Colin, Raguénès, Crassous, *et al.*, 2008).

Dans un deuxième temps, la méthode de détection des gènes *phaC* et *4HBCoAt* a été optimisée sur une dizaine d'autres souches de la collection Ifremer-LM2E, appartenant à des genres bactériens différents (*Acinetobacter*, *Paracoccus*, *Vibrio* etc.), et dont la capacité de production de PHAscl était avérée. Le protocole d'extraction de matériel génomique ainsi que les conditions optimales liées à l'étape d'amplification génique par PCR ont alors été définis (concentrations en réactifs PCR, nombre de cycles, températures d'hybridation).

### II. 2. 3. 2. 1. Extraction de matériel génomique

Le même procédé d'extraction génomique a été appliqué aux 344 isolats de l'étude, de façon à créer une banque de lysats cellulaires, directement utilisables comme matrice ADN pour l'étape d'amplification génique par PCR. Tout d'abord, les souches ont été cultivées dans des tubes contenant 8 mL de milieu d'enrichissement Zobell, à partir des cryotubes de la collection de travail préalablement élaborée. En fin de phase exponentielle de croissance, 500 µL de culture ont été prélevés et incubés dans un tube Eppendorf stérile de 1,5 mL. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 10000 rpm pendant 10 min, et les surnageants ont été éliminés avant l'ajout de 500 µL d'eau ultra pure stérile. En parallèle, environ 10 µL de chaque cryotube ont étéensemencés sur gélose Zobell pendant trois jours à 34°C, afin de vérifier la pureté de chaque isolat. Enfin, les pré-lysats cellulaires ont été stockés à -80°C, la dernière étape d'extraction d'ADN, ou thermolyse, se déroulant durant le premier cycle de PCR.

## II. 2. 3. 2. 2. Amplification des gènes 16S, phaC et 4HBCoAt par technique PCR

Cette méthode de criblage se voulant rapide et peu onéreuse, la matrice ADN de chaque souche a servi à l'amplification PCR de plusieurs gènes d'intérêt au cours du même cycle PCR et sur une même plaque PCR de 96 puits. D'une part, l'amplification du **gène universel** codant l'**ARNr 16S** a été entreprise grâce au couple d'amorces **E8F/1492R** (E8F 5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' et 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg *et al.*, 1991), de façon à vérifier la qualité d'extraction d'ADN à partir de chaque isolat, et l'absence de molécules inhibitrices de PCR.

**Simultanément**, les couples d'amorces **PHAsclf/PHAsclr1** et **PHAsclf/PHAsclr2** (destinés à l'amplification du gène *phaC*) et **4HBf/4HBr1** et **4HBf/4HBr2** (ciblant le gène *4HBCoAt*) ont été employés afin d'appréhender les capacités génétiques de **production** de PHAscl, et plus particulièrement de **P(3HB4HB)** en une seule expérimentation.

Pour chaque souche, cinq mix PCR ont été constitués contenant 5 µL de lysat cellulaire, 1,25 µL (soit une concentration de 1,25 µmol/L) d'amorces forward et reverse (Eurogentec), 13 µL de solution tampon (Promega, Madison, USA) contenant 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de désoxynucléotides triphosphate (100 µmol/L), 0,5 µL (2,5 U) de GoTaq polymérase, et de l'eau ultra pure stérile pour un volume final de 50 µL. Le programme PCR unique adapté aux cinq paires d'amorces consistait en un premier cycle de thermolyse de 20 min à 96°C, suivi de 35 cycles de dénaturation de 60 s à 94°C, d'hybridation de 60 s à 56°C et d'élongation de 2 min à 72°C, avant une dernière phase de 7 min à 72°C.

En routine, 16 souches ont été testées par plaque PCR 96 puits, en plus des témoins (contrôle positif : lysat cellulaire de la souche *H. profundus* AT1214, et contrôle négatif : eau ultra pure stérile pour confirmer l'absence de contamination par quelconque source d'ADN dans les mix PCR). En fin d'amplification génique par PCR, les produits PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (800 mg d'agarose, 5 µL de bromide d'éthidium pour 100 mL de solution tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA)) qui permet la séparation des acides nucléiques en fonction de leur taille sous l'influence d'un champ électrique.

Ensuite, 10 µL de produits PCR et 5 µL de marqueur de tailles moléculaires comprises entre 200 pb et 10 kpb (Smart Ladder, Eurogentec) sont déposés séparément dans les puits

d'agarose, avant submersion dans une solution tampon TAE. La migration des fragments d'intérêt est initiée à l'aide d'un courant électrique ajusté à 80 V et 100 A pendant 45 min. Enfin, les produits PCR ont été révélés aux rayons ultraviolets, à l'aide d'un transilluminateur Biorad Molecular (Imager Chemidoc TMXRS+, Hercules, USA) et du logiciel QuantaBiogène (BioGene Technology, HongKong, China).

## II. 2. 4. Approche culturale pour la production de copolymères de P(3HB4HB) par fermentation bactérienne

### II. 2. 4. 1. Production de P(3HB4HB) en erlenmeyers selon un protocole de culture standardisé

Les souches bactériennes positives au criblage moléculaire pour la recherche des gènes *phaC* et *4HBCoAt* ont été cultivées en milieu liquide, en erlenmeyers, pour la production de copolymères de P(3HB4HB). Le protocole de fermentation a volontairement été **standardisé** afin de s'adapter au plus grand nombre de souches bactériennes. Ainsi, les mêmes conditions de culture ont été appliquées pour tous les isolats.



Figure 27. Schéma du procédé de production de PHA en erlenmeyers en deux phases.

La culture pour la production de PHA a été réalisée en deux étapes, comprenant une première phase de **division cellulaire** pendant laquelle les cellules ont étéensemencées dans un milieu d'enrichissement Zobell (de 8 à 1800 mL), de façon à obtenir une densité cellulaire maximale (**Figure 27**). Ainsi, en pratique et pour chaque souche présélectionnée par criblage moléculaire, 800 µL de solution stock ont étéensemencés dans un tube contenant 8 mL de milieu Zobell pendant une nuit à 34°C. Le lendemain, ces 8 mL de culture ont été incubés dans un erlenmeyer de 200 mL pendant 8 h, puis ces 200 mL ont été transférés dans un dernier erlenmeyer de volume total 1,8 L pendant une nuit.

En fin de phase exponentielle de croissance, les cultures ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 15 min. Les culots bactériens ont ensuite été homogénéisés dans de l'eau de mer diluée stérile (20 g/L de NaCl), avant incubation dans un second milieu de culture d'1,8 L destiné à la **synthèse de PHA**, dépourvu de tout élément azoté mais enrichi en substrats carbonés, pour initier la production de copolymères de P(3HB4HB). Pour ces expériences, les sources de carbone choisies étaient le **glucose (5 g/L)**, assimilable par la majorité des bactéries et précurseur du 3-hydroxybutyrate (3HB), et le Na-4HB 4 M ou **γ-hydroxybutyrate (1,5 g/L)**, molécule substrat de l'enzyme 4HBCoAt conduisant à la polymérisation du 4-hydroxybutyrate (4HB).

La phase de production a duré 20 à 72 h, en fonction du temps nécessaire à chaque souche pour accumuler de façon maximale des granules intracellulaires de PHA. L'apparition et la quantité de granules ont été estimées à l'état frais par observations au microscope optique à contraste de phase. Ces bilans microscopiques ont également permis de surveiller les éventuels changements de morphologie de chaque isolat et l'absence de micro-organismes contaminants.

En fin d'expérience, seules les souches ayant produit un copolymère à un rendement supérieur à 150 mg par litre de culture, ou à un ratio de 4HB supérieur à 5%, ont été sélectionnées pour une étape ultérieure de production de PHA suivant différents paramètres de culture, notamment en bioréacteur.

## II. 2. 4. 2. Optimisation de la production de P(3HB4HB) en bioréacteurs

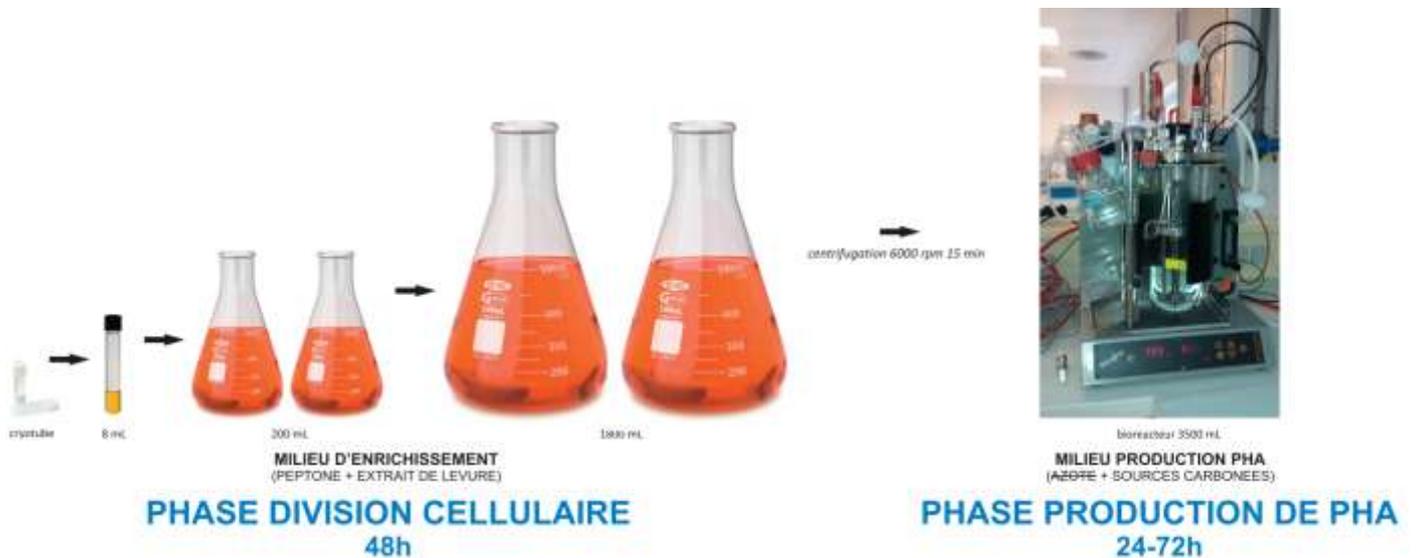
Les souches bactériennes ayant produit des copolymères de P(3HB4HB) à des rendements au moins équivalents à 150 mg/L ou à des ratios de 4HB supérieurs à 5% durant l'étape de fermentation en erlenmeyers ont été sélectionnées pour une seconde phase de culture en bioréacteurs. En effet, la culture en bioréacteur a pour objectif d'augmenter les rendements de PHA produits, notamment grâce au contrôle de certains paramètres de culture tels que le pH, la température ou l'apport en oxygène, mais également d'obtenir des informations quant au processus d'accumulation de PHA propre à chaque souche (**Figure 28**).



**Figure 28.** Composants d'un bioréacteur Minifors 5 L (INFORS).

**a.** compartiment milieu de culture de volume utile 3,5 L **b.** plaque chauffante **c.** moteur **d.** axe de rotation **e.** solutions de NaOH (1M) et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) **f.** sonde pH **g.** sonde O<sub>2</sub> **h.** sonde T°C **i.** flux d'air filtré sur 0,2 µm **j.** flacon d'échantillonnage stérile **k.** panneau de contrôle.

Lors de ces expérimentations et pour chaque isolat bactérien, la phase d'enrichissement en milieu Zobell a été menée en simultanément dans deux erlenmeyers de volumes croissants, afin de pouvoir ensemercer les 3,5 L de volume utile dans chaque bioréacteur (Infors, Bottmingen, Suisse) (**Figure 29**).



**Figure 29.** Schéma du procédé de production de PHA en bioréacteurs en deux phases.

Les cultures menées jusqu'en fin de phase exponentielle de croissance contenues dans deux erlenmeyers de volume total 1,8 L ont été centrifugées à 6000 rpm pendant 15 min, puis les culots bactériens ont été repris et cumulés dans 100 mL d'eau de mer diluée à 20 g/L de NaCl. Ces derniers ont finalement été ensemençés dans des bioréacteurs contenant 3,4 L de milieu dédié à la production de copolymères de P(3HB4HB).

Au cours de ces expériences en bioréacteur, le pH est ajusté automatiquement à 7,6 unités à partir de solutions de soude NaOH (1M) et d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M), la température maintenue à 34°C, avec un apport d'air de 30 L/h permettant l'oxygénation homogène du milieu de culture. Par ailleurs, 100 µL de solution tensioactive (Struktol, Stow, USA) ont pu être ajoutés au milieu de culture durant la période d'incubation, si la diminution du flux d'air n'a pas suffi à inhiber l'accumulation de mousse. Parallèlement, des observations microscopiques à l'état frais ont été réalisées une à trois fois par jour sur chaque culture pour apprécier la morphologie des bactéries, l'accumulation intracellulaire de PHA et l'absence de contaminants.

La période de fermentation en bioréacteur propre à chaque souche a été stoppée après 5 à 96 h d'incubation en fonction de l'état général de la culture visualisé par microscopie, et de la vitesse de consommation de soude proportionnelle à l'acidification du milieu, elle-même corrélée à la production de polymères. Enfin, les cultures ont été centrifugées 20 min à 8000 rpm, puis les culots bactériens ont été congelés et lyophilisés.

## **II. 2. 5. Extraction, purification et caractérisation des PHA**

### **II. 2. 5. 1. Extraction et purification des PHA**

En fin de phase de production de PHA, les cultures ont été centrifugées à 8000 rpm pendant 20 min, puis les culots bactériens ont été congelés et lyophilisés. Les lyophilisats ont été broyés puis homogénéisés dans du chloroforme (Fischer Scientific, Hampton, USA) pendant 4 h à 50°C. Après centrifugation des solutions à 10000 rpm pendant 10 min, les phases chloroformiques contenant les PHA extraits ont été récupérées et séchées pour obtenir l'extrait brut de PHA. Après pesée, les extraits bruts ont été redissous dans du chloroforme, puis purifiés par précipitation dans 10 volumes de méthanol froid, de manière à éliminer toute trace d'impuretés lipidiques. Les polymères purifiés ont été récupérés, séchés et stockés à température ambiante.

### **II. 2. 5. 2. Caractérisation des PHA**

Environ 10 mg de chaque PHA purifié ont été dissous à 25°C dans 600 µL de chloroforme deutéré ( $\text{CHCl}_3\text{-d}_6$ ) (Eurisotop, Saint-Aubin, France), puis analysés par RMN  $^1\text{H}$  grâce à un spectromètre Bruker (Billerica, USA) 400 DRX opérant à 400 MHz. Les déplacements chimiques ont été reportés en ppm relativement au signal du 2,2,3,3-tétradeutéro-3-(triméthylsilyl)-propanoic acide sodium, afin d'appréhender la nature du polymère et de quantifier les proportions de monomères de 3HB et de 4HB.

## II. 2. 6. Analyses phylogénétiques des souches productrices de PHA issues d'environnements marins profonds

Le dernier objectif de cet axe microbiologie visait à explorer la diversité bactérienne, capable de synthétiser des PHA à courtes chaînes, associée aux environnements hydrothermaux profonds des océans Atlantique et Pacifique. Ainsi, la caractérisation taxonomique des souches bactériennes, de la collection Ifremer-LM2E, productrices de PHA<sub>sl</sub> a été réalisée par séquençage partiel du gène universel codant l'ARNr 16S.

A partir du lysat cellulaire de chaque souche, l'amplification partielle du gène 16S par PCR a été menée directement sur une plaque de 96 puits dédiée, fournie par le laboratoire de séquençage Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Le protocole PCR est identique à celui précédemment décrit : 5 µL de lysat cellulaire, 1,25 µL (soit une concentration de 1,25 µmol/L) d'amorces E8F et 1492R, 13 µL de solution tampon comprenant 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de désoxynucléotides triphosphate (100 µmol/L), 0,5 µL (2,5 U) de GoTaq polymérase, qsp à 50 µL avec de l'eau ultra pure stérile. Le programme PCR consistait en un premier cycle de 20 min à 96°C, suivi de 31 cycles de dénaturation de 60 s à 94°C, d'hybridation de 60 s à 53°C et d'élongation de 2 min à 72°C, avant une dernière phase de 7 min à 72°C.

Les produits PCR bruts ont été expédiés au laboratoire de séquençage Eurofins Genomics dans la journée, après vérification du succès de l'amplification des gènes marqueurs taxonomiques 16S par électrophorèse sur gel d'agarose. A réception des résultats, les séquences nucléotidiques révélées ont été nettoyées puis comparées à la base de données GenBank (NCBI BLAST, <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>), afin d'obtenir l'affiliation taxonomique de chaque isolat (*a minima* du genre bactérien).

Ensuite, le positionnement phylogénétique relatif à l'évolution moléculaire du gène codant l'ARNr 16S de chaque individu a été recherché au sein de la population d'intérêt. Pour ce faire, les séquences ont été éditées dans le programme BioEdit puis alignées grâce au logiciel MUSCLE EMBL. En outre, les séquences nucléotidiques similaires à plus de 99% ont été regroupées en une seule souche référence, afin de limiter l'encombrement de l'arbre

phylogénétique. Enfin, les inférences phylogénétiques ont été traitées suivant l'algorithme neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) avec corrections de Jukes et Cantor, à l'aide du programme SEAVIEW version 3.2 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) (Galtier *et al.*, 1996). La robustesse de la topologie a été testée par rééchantillonnage de 1000 bootstraps.

## II. 2. 7. Séquençage des produits PCR amplifiés par les couples d'amorces PHAsclf/r et 4HBf/r

Le séquençage des produits PCR amplifiés à l'aide des amorces PHAsclf/r1.r2 et 4HBf/r1.r2 a été entrepris afin de confirmer leur appartenance aux groupes de gènes *phaC* et *4HBCoAt*, par comparaison nucléotidique aux des gènes d'ores et déjà décrits dans la base de données NCBI. Ces données permettront également d'étudier le positionnement phylogénétique de ces gènes au sein de la biodiversité bactérienne.

Comme évoqué lors du point précédent, le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S a été réalisé à partir de produits PCR bruts, à l'aide du couple d'amorces E8F et 1492R. Ces amorces PCR suffisamment longues et non dégénérées ont permis d'initier l'amplification unique et spécifique du gène 16S chez les individus testés.

*A contrario*, du fait de la dégénérescence des couples d'amorces PHAsclf/r1.r2 et 4HBf/r1.r2, les produits PCR bruts correspondants n'ont pas pu être séquencés directement. Ainsi, pour éviter la contamination des gènes d'intérêt *phaC* et *4HBCoAt* par des fragments d'ADN non spécifiques et augmenter le succès de l'analyse, les produits PCR bruts ont été purifiés, à l'aide d'un kit commercial ou par clonage, avant l'étape de séquençage.

## II. 2. 7. 1. Purification des produits PCR amplifiés par les amorces PHAscl et 4HB à l'aide d'un kit commercial

Suite aux étapes d'amplification par PCR et d'électrophorèse sur gel d'agarose, les fragments d'acides nucléiques relatifs aux gènes *phaC* et *4HBCoAt* ont été minutieusement découpés à l'aide d'un scalpel stérile, sur le gel déposé sur une plaque à rayons ultraviolets. Ces bandes d'agarose ont ensuite été purifiées à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne), grâce auquel l'ADN cible est retenu sur une membrane de silice en présence de sels chaotropiques. Cette technique rapide et peu onéreuse permet l'élimination des composants macromoléculaires solubles indésirables au moyen d'un tampon éthanolique, tout en préservant les fragments nucléotidiques d'intérêt, qui sont ensuite élués par une solution alcaline.

Les bandes d'agarose contenant les produits PCR sont alors entreposées dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL stériles puis pesées. Selon les instructions d'utilisation du kit, 200 µL de tampon salin NT1 sont ajoutés pour 100 mg de gel, avant incubation au moins 10 min à 50°C dans un bain-marie jusqu'à la fonte complète des bandes d'agarose. Ensuite, les solutions sont versées sur des colonnes Clean-up disposées sur des tubes collecteurs de 2 mL avant un premier cycle de 30 s de centrifugation à 11000 rpm. Les surnageants sont jetés et l'opération est réitérée deux fois pour assurer un meilleur résultat de purification.

Ensuite, 700 µL de tampon éthanolique NT3 sont versés sur chaque colonne avant séchage par centrifugation pendant 60 s à 11000 rpm. La manipulation est répétée une fois avant élimination du surnageant. Immédiatement, les colonnes Clean-up sont transvasées sur de nouveaux tubes collecteurs de 1,5 mL stériles, puis lavées par 30 µL de tampon alcalin NE pendant 5 min à température ambiante.

Enfin, l'ADN purifié est récupéré par centrifugation à 11000 rpm pendant 60 s. Une dernière électrophorèse sur gel d'agarose est effectuée à partir des produits PCR purifiés pour apprécier leur qualité avant expédition vers le laboratoire Eurofins Genomics, pour séquençage dans les deux sens de lecture des gènes d'intérêt (5' et 3'). A réception des

séquences nucléotidiques, comme précédemment, celles-ci sont nettoyées puis comparées à la base de données NCBI GenBank.

## II. 2. 7. 2. Purification des produits PCR PHAscl par clonage

Bien que coûteuse et chronophage, la technique de clonage de séquences d'ADN cibles *via* un vecteur améliore nettement la qualité du séquençage (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). En effet, les produits PCR purifiés sont insérés dans un plasmide, lui-même transféré dans une cellule bactérienne dite compétente, pour assurer la copie de ceux-ci à l'identique et en grand nombre. Cette technique a été utilisée en complément de la première méthode de purification, pour valider certains résultats de séquençage.

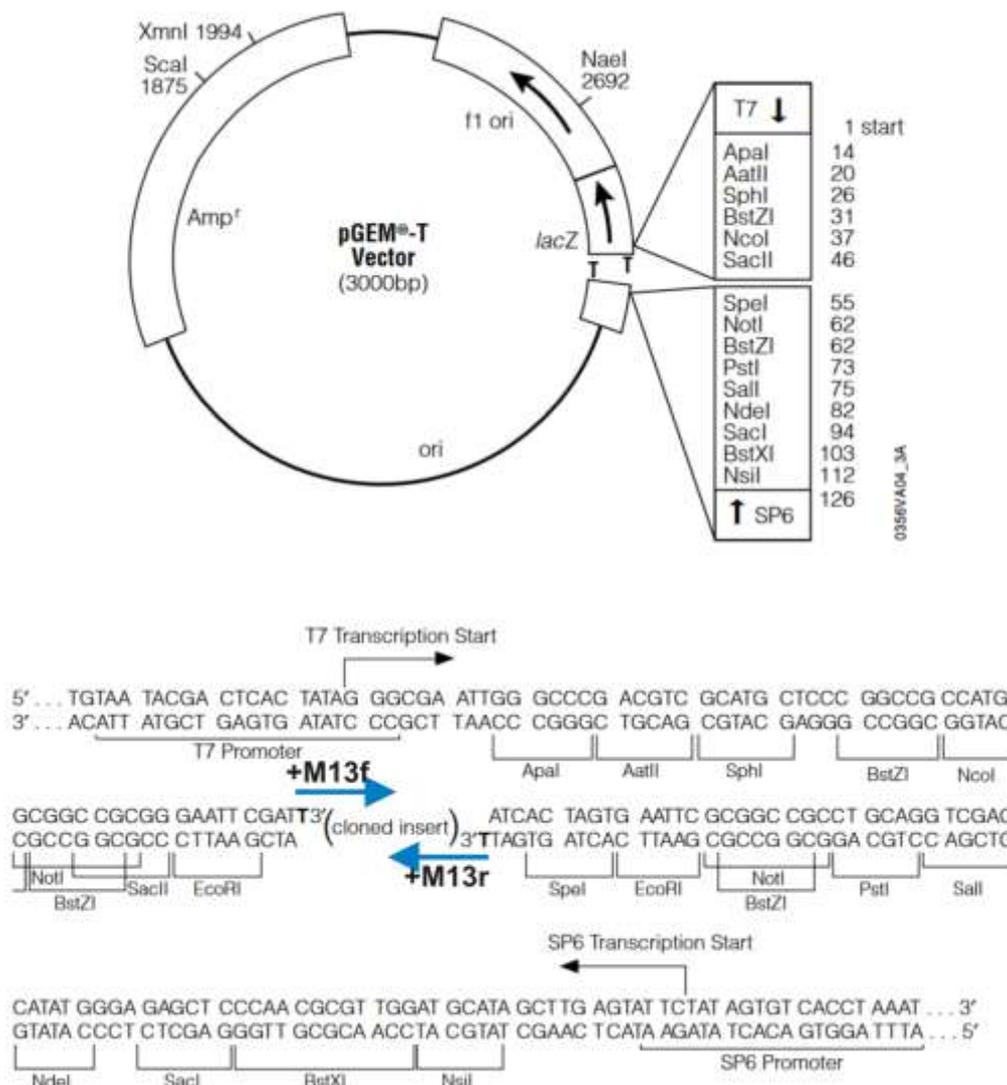


Figure 30. Carte génétique et séquences promotrices du vecteur pGEM-T (Promega).

Ainsi, les produits PCR bruts relatifs au gène *phaC* (produits PCR 4HB non traités) sont découpés directement sur gel d'agarose, et purifiés à l'aide du kit commercial NucleoSpin Extract II. Le même jour, afin d'anticiper l'étape de ligation des produits PCR purifiés dans le vecteur, 1 µL de vecteur plasmidique pGEM-T (**Figure 30**) et 1 µL de ligase T4 issus du kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) sont incubés à froid avec 3 µL de produits PCR purifiés dans des tubes PCR stériles. Les solutions sont conservées une nuit à 4°C.

Après une nuit à 4°C, pour débiter la phase de transformation 2 µL de produit de ligation sont versés dans un tube de 1,5 mL contenant 50 µL de cellules compétentes *E. coli* JM109. Après 20 min d'incubation sur glace, un choc thermique est provoqué pour assurer la transformation des cellules, c'est-à-dire l'insertion des vecteurs plasmidiques dans les bactéries compétentes. Celles-ci sont alors plongées précisément 45 s dans un bain-marie à 42°C, avant une dernière incubation sur glace pendant 2 min.

Par la suite, 600 µL de milieu de culture Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC : 20 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl 1M, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de MgSO<sub>4</sub> et 20 mM de glucose) favorisant la transformation des cellules *E. coli* sont ajoutés au mélange cellules/plasmides, avant incubation pendant 1h15 à 37°C, sous agitation horizontale à 150 rpm.

Enfin, 50, 100 ou 200 µL de solution microbienne transformée sont ensemencés une nuit à 37°C sur cinq géloses sélectives composées de 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de NaCl, d'1 mL d'ampicilline (100 µg/mL), de 500 µL d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside IPTG (0,1 M) et de 2 mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside X-Gal (50 mg/mL).

Ces géloses particulières permettent de repérer les bactéries ayant intégré l'insert nucléotidique d'intérêt ou non. En effet, les bactéries transformées apparaissent de couleur blanche opaque, car l'insert s'avère correctement intégré au sein du plasmide, et positionné spécifiquement au milieu du gène *lacZ*, rendant l'expression de celui-ci impossible (**Figure 30**). Ainsi, l'enzyme β-galactosidase codée par le gène *lacZ* ne peut être traduite, et par conséquent ne peut hydrolyser le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside présent dans la gélose, où le bromo-4-chloro-3-indolyl est un composé de couleur bleue si hydrolysé.

Ainsi après une nuit, les colonies bactériennes d'*E. coli* JM109 de couleur blanche, c'est-à-dire ayant bien intégré le vecteur plasmidique contenant les séquences ADN d'intérêt, sont sélectionnées pour une nouvelle étape d'amplification par PCR. Pour ce faire, une nouvelle banque de matériel génomique est constituée par prélèvement de quelques microgrammes d'une colonie blanche positive à l'aide d'un cône stérile. Ces cônes sont ensuite directement mis au contact de 100 µL d'eau ultra pure stérile dans une plaque PCR de 96 puits. La plaque annotée est vortexée pendant 5 min avant le transfert de 1 µL de lysat cellulaire dans une seconde plaque PCR, à l'aide d'une pipette multicanaux.

Ensuite et en vue de générer l'amplification PCR complète des inserts cibles, 14 µL de mix PCR sont ajoutés dans chaque puits. Ce réactif PCR comprend 0,03 µL (1,25 µmol/L) d'amorces forward et reverse de type M13 (M13f 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3', M13r 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'), dont les séquences complémentaires font partie intégrante du vecteur plasmidique, et sont situées précisément en amont et en aval de l'insert à amplifier (**Figure 30**). De plus, 4,2 µL de solution tampon dont 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 µL de désoxynucléotides triphosphate (100 µmol/L), 0,075 µL (2,5 U) de GoTaq polymérase et 9,365 µL d'eau ultra pure stérile sont également ajoutés lors de la préparation de ce mélange PCR. Le programme appliqué au thermocycleur consiste en un premier cycle de thermolyse de 20 min à 96°C, suivi de 30 cycles de dénaturation de 60 s à 94°C, d'hybridation de 90 s à 55°C et d'élongation de 2 min à 72°C, avant une dernière phase de 7 min à 72°C. L'amplification des produits PCR et la taille des inserts sont vérifiées à nouveau par électrophorèse sur gel d'agarose.

En parallèle et pour assurer la conservation des clones, 100 µL de milieu d'enrichissement Lysogeny Broth (LB) suppléé en agent antibiotique (10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de NaCl et 1 mL d'ampicilline à 100 µg/mL) sont déposés dans chaque puits d'une plaque de culture stérile. Puis, 10 µL de solution clones/eau ultra pure précédemment constituée sontensemencés. La plaque de culture est incubée une nuit à 37°C sous agitation horizontale, fixée à 150 rpm.

Le lendemain, 10 µL de solution clones/LB sont piqués dans les puits gélosés d'une plaque de séquençage fournie par le laboratoire de séquençage GATC (Constance, Allemagne). Celle-ci est soigneusement conditionnée et expédiée pour un traitement dans

les 24 h. Entre temps, 20% de glycérol cryoprotectant stérile sont ajoutés aux 90 µL de solution clones/LB restants, avant cryoconservation à -80°C. A réception des résultats, les séquences nucléotidiques sont nettoyées puis comparées à la base de données NCBI GenBank.

## II. 3. Résultats & Discussion

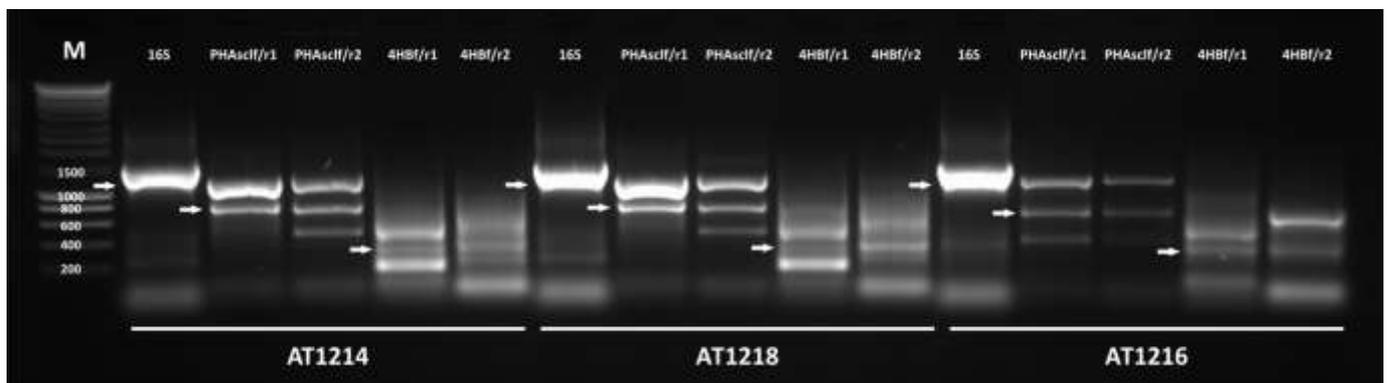
### II. 3. 1. Détection par criblage moléculaire PCR des bactéries potentiellement productrices de P(3HB4HB)

Le premier objectif de cette thèse visait à mettre au point une méthode de criblage moléculaire par technique PCR, rapide et applicable en routine à un grand nombre d'échantillons, pour la détection de bactéries potentiellement productrices de PHAscl de type P(3HB4HB). Pour ce faire, deux gènes marqueurs indispensables à la production de P(3HB4HB) ont été choisis : le gène *phaC*, codant la protéine PHA synthase de type I, responsable de la polymérisation des unités 3-hydroxyalcanoates à courtes chaînes, et le gène *4HBCoAt*, codant l'enzyme 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transferase, capable de fixer le coenzyme A aux monomères de 4HB, ensuite pris en charge par la même PHA synthase de type I pour constituer les copolymères d'intérêt.

#### II. 3. 1. 1. Détection des gènes *16S*, *phaC* et *4HBCoAt* par criblage moléculaire

Les **344 souches** aérobies mésophiles viables de la collection Ifremer-LM2E ont été testées selon le même protocole PCR pour rechercher la présence des gènes *phaC* et *4HBCoAt* au sein de leur patrimoine génétique. L'amplification du gène universel codant l'ARNr **16S** a également été entreprise pour témoigner du succès de l'extraction génomique à partir de chaque lysat cellulaire. La **Figure 31** présente un gel d'agarose des produits PCR

des souches AT1214 (témoin positif), AT1218 et AT1216, amplifiés grâce aux amorces 16S, PHAsclf/r1, PHAsclf/r2, 4HBf/r1 et 4HBf/r2, et révélés par rayons ultraviolets.



**Figure 31.** Gel d'électrophorèse des produits PCR des souches AT1214, AT1218 et AT1216, amplifiés par les amorces 16S, PHAsclf/r1.r2 et 4HBf/r1.r2.

*M* : marqueur de taille en paires de bases, les flèches représentent les produits PCR d'intérêt.

Le fragment unique correspondant à l'amplification totale du gène marqueur taxonomique et universel codant l'**ARNr 16S** a été retrouvé chez toutes les souches, avec une taille attendue de **1500 paires de bases (pb)**. Ce résultat indique que tous les lysats cellulaires préparés directement à partir des cultures bactériennes, sans étape préalable de purification, et thermolysés durant la première phase du cycle PCR, ont délivré une quantité d'ADN suffisante pour générer l'amplification génique par PCR.

Concernant l'amplification **partielle** du gène *phaC*, la longueur des fragments calculée chez l'espèce référence *Ralstonia eutropha* était de 770 pb. Toutefois, l'alignement nucléotidique réalisé pour la conception des amorces à partir des gènes *phaC* de 29 souches bactériennes terrestres et marines a révélé que, chez certains individus, la taille de l'amplicon pouvait atteindre 810 pb. Ainsi, toute bande mesurant entre **770 et 810 pb** a été considérée comme positive, qu'elle ait été amplifiée uniquement par le couple d'amorce PHAsclf/r1, ou le couple PHAsclf/r2, ou les deux.

En effet, les gènes *phaC* et *4HBCoAt* peuvent être détenus indépendamment au sein du génome de chaque souche bactérienne (Steinbüchel *et al.*, 1994; Meng *et al.*, 2014). De plus, dans cette étude la stratégie de criblage employée ne s'est pas voulue restrictive et a préféré inclure tout résultat potentiellement positif, pour n'écarter aucune souche

productrice de PHAscl. **Ainsi au total, 163 souches appartenant à la collection Ifremer-LM2E ont été caractérisées comme porteuses du gène *phaC*.**

La même démarche a été menée avec les souches potentiellement porteuses du gène ***4HBCoAt***, où des bandes mesurant **380 pb** ont été recherchées après amplification génique par méthode PCR. La longueur attendue de l'amplicon a été calculée à partir de la souche modèle *Clostridium kluyveri*, les alignements protéiques et nucléotidiques préalablement effectués n'ayant pas révélé de variabilité particulière en matière de taille pour ce gène. Dès lors, tous les fragments obtenus d'une longueur d'environ 380 pb sur gel d'agarose ont été jugés positifs, et **163 isolats de la collection Ifremer-LM2E ont été considérés porteurs du gène codant la 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transferase.**

Cependant, de nombreux autres fragments de tailles inférieure ou supérieure à ceux d'intérêt ont été amplifiés par les couples d'amorces PHAsclf/r1.r2 et 4HBf/r1.r2, certainement du fait de l'aspécificité et de la dégénérescence de celles-ci. Or, seules les bandes de longueur attendue ont été prises en compte durant ce travail de criblage. La correspondance génique des produits PCR annexes n'a par ailleurs pas été recherchée.

**En conclusion, le criblage moléculaire a permis d'isoler 163 souches porteuses du gène *phaC*, 163 autres isolats possédant le gène *4HBCoAt*, pour un total de 89 bactéries détenant ces deux gènes à la fois, et donc potentiellement capables de synthétiser des copolymères de P(3HB4HB) (Tableaux 05 et 06).**

**Tableau 05.** Nombre de souches bactériennes possédant les gènes *phaC*, *4HBCoAt*, ou les deux, classés par campagne océanographique Ifremer.

<b>CAMPAGNE</b>	<b>SOUCHES CRIBLEES</b>	<b><i>phaC</i></b>	<b><i>4HBCoAt</i></b>	<b><i>phaC+4HBCoAt</i></b>
<b>HYDRONAUT</b>	17	11	4	4
<b>STARMER</b>	115	60	55	31
<b>HERO</b>	5	4	4	4
<b>GUAYNAUT</b>	27	5	14	2
<b>MAR</b>	14	8	6	4
<b>MICROSMOKE</b>	101	55	45	30
<b>ALIPOR</b>	1	0	1	0
<b>ATOS</b>	35	14	20	10
<b>PHARE</b>	2	1	1	1
<b>BIOSPEEDO</b>	27	5	13	3
<b>TOTAL</b>	<b>344</b>	<b>163</b>	<b>163</b>	<b>89</b>

**Tableau 06.** Récapitulatif des 237 souches bactériennes possédant le gène *phaC*, le gène *4HBCoAt*, ou les deux.

(en gris : les souches potentiellement productrices de copolymères de P(3HB4HB) mais dont l'étape de fermentation cellulaire n'a pas été testée)

Souche	<i>phaC</i>	<i>4HBCoAt</i>	Souche	<i>phaC</i>	<i>4HBCoAt</i>	Souche	<i>phaC</i>	<i>4HBCoAt</i>
ST265		X	ST538		X	MS932	X	
ST266		X	ST539		X	MS935	X	
ST268	X		ST540	X		MS937	X	X
ST269	X	X	ST542		X	MS940	X	
ST270	X		ST543		X	MS941	X	X
ST272	X		ST714		X	MS942	X	
ST273	X	X	ST719	X	X	MS944	X	
ST276	X	X	ST721		X	MS945		X
ST277	X	X	BI725	X	X	MS950	X	X
ST279	X	X	BI729	X	X	MS951	X	X
ST282	X	X	BI732		X	MS955	X	X
ST283	X	X	BI734		X	MS956	X	
ST286	X	X	BI740		X	MS963		X
ST287		X	BI742	X	X	MS964	X	
ST288	X	X	BI743		X	MS965	X	
ST295		X	BI744		X	MS967	X	
ST298	X	X	BI746		X	MS970	X	
ST299	X	X	BI748		X	MS973	X	X
ST300	X	X	AL749		X	MS975		X
ST301		X	HY750	X		MS976		X
ST302	X	X	HY751	X		MS977	X	X
ST303	X		HY753	X		MS978	X	X
ST305	X		HY754	X		MS979	X	X
ST308	X	X	HY755	X	X	MS980	X	X
ST309	X		HY756	X	X	MS981	X	X
ST310	X	X	HY757	X		MS982	X	X
ST311	X		HY758		X	MS983	X	X
ST312		X	HY760	X		MS984	X	X
ST314	X	X	HY761	X		MS985		X
ST315	X	X	HY762	X		MS986	X	X
ST316	X	X	HY763	X	X	MS988	X	X
ST317		X	GY767	X	X	MS989	X	X
ST318	X	X	GY769		X	MS990	X	X
ST320	X	X	GY773		X	MS991	X	X
ST321	X	X	GY774		X	MS992	X	X
ST324	X		GY776		X	MS993	X	
ST327	X		GY777		X	MS994	X	X
ST328		X	GY778		X	MS996	X	X
ST329	X	X	GY779		X	MS998		X
ST330	X	X	GY780		X	MS999	X	X
ST331	X	X	GY789		X	MS1001	X	X
ST333		X	GY790	X		MS1002	X	X
ST334	X	X	GY792	X		MS1003		X
ST335	X		GY793		X	MS1004		X
ST337	X		GY795	X	X	MS1005	X	X

ST338		X	GY796	X		MS1006	X	X
ST340	X	X	GY797		X	MS1007	X	X
ST345	X	X	HE798	X	X	MS1008		X
ST346	X		HE799	X	X	MS1009		X
ST347	X	X	HE800	X	X	MS1011		X
ST348	X	X	HE801	X	X	MS1012		X
ST349	X		MA880	X		MS1013		X
ST350	X	X	MA881	X		MS1014		X
ST351	X		MA883		X	GY1108		X
ST352	X		MA885	X		AT1210		X
ST353	X		MA887		X	AT1211	X	
ST354	X		MA891	X	X	AT1212	X	X
ST355	X		MA892	X		AT1213	X	X
ST358		X	MA893	X	X	AT1214	X	X
ST359		X	MA896	X	X	AT1215		X
BI361	X		MA897	X	X	AT1216	X	X
BI362	X		MS906	X	X	AT1217		X
BI367		X	MS907	X		AT1218	X	X
BI370		X	MS908	X		AT1219		X
BI379		X	MS909		X	AT1220		X
ST395	X	X	MS911	X		AT1221	X	X
ST409	X		MS912	X		PH1226	X	X
ST411		X	MS914	X		AT1229	X	X
ST412	X		MS916	X		AT1230	X	X
ST414	X		MS917	X		AT1233	X	X
ST416	X		MS919	X		AT1234		X
ST416	X	X	MS920		X	AT1235		X
ST417	X		MS921	X		AT1237	X	
ST419		X	MS925	X		AT1238		X
ST420		X	MS926	X		AT1239	X	
ST421		X	MS927	X		AT1241		X
ST426	X		MS928	X		AT1245	X	
ST427	X		MS930	X		AT1254	X	X
ST428	X		MS931	X		AT1256		X

## II. 3. 1. 2. Séquençage des produits PCR amplifiés par les amorces PHAsclf/r1 et 4HBf/r1

Durant ce travail de thèse, les expériences de criblage moléculaire, de production de PHA de type P(3HB4HB) par fermentation bactérienne et d'analyses phylogénétiques ont été effectuées conjointement pendant près de 18 mois. Le séquençage des produits PCR amplifiés à l'aide des couples d'amorces PHAsclf/r1 et 4HBf/r1 n'a été réalisé qu'en fin de période sur un panel représentatif d'échantillons appartenant à des genres bactériens différents, après purification par voie chimique ou par clonage.

Le séquençage des produits PCR amplifiés à partir des amorces PHAsclf/r1, PHAsclf/r2, 4HBf/r1 et 4HBf/r2, et préalablement purifiés par le kit commercial NucleoSpin Extract II, a donné des résultats difficilement exploitables, certainement en raison de l'hétérogénéité et de la faible qualité des séquences. En effet, seules des séquences de 20 à 150 pb sur les 16 échantillons analysés ont pu être récupérées, alors que les tailles de séquences attendues étaient d'environ 800 et 400 pb.

Suite à cet échec et du fait des contraintes calendaires, seuls des fragments génomiques générés à l'aide du couple d'amorces PHAsclf/r1 ont pu être testés. La totalité des produits PCR amplifiés par clonage a été séquencée avec succès, et quelques **94 séquences nucléotidiques affiliées à 11 genres bactériens différents** ont été récupérées, nettoyées puis alignées grâce au programme Clustal.

Après traitement informatique, les nucléotides provenant tant du vecteur pGEM-T, des amorces M13r rattachées à l'insert et PHAsclr1 ont été retrouvés sur toutes les séquences, confirmant le séquençage des produits PCR cibles amplifiés à l'aide du couple d'amorces PHAsclf/r1 (**Figure 32**).



**Figure 32.** Position et appartenance des nucléotides retrouvés en début de chaque fragment cloné et séquencé.

Chaque séquence a ensuite été comparée à la base de données NCBI Blast, tout d'abord sous forme de séquence nucléotidique (**BlastN**), puis sous forme de séquence protéique (**BlastX**). Les réponses 'hit Blast', c'est-à-dire ayant les pourcentages de similarité les plus élevés par rapport à la séquence requête, sont répertoriées dans le **Tableau 07**.

Dans tous les cas et quelque soit la souche, les séquences nucléotidiques soumises au BlastN n'ont pas été associées à des gènes particuliers mais plutôt à des fragments de génomes complets, partageant des taux de similarité variant entre 4 et 93%. Ce résultat peut être expliqué par le déficit d'annotation des gènes dans la base de données NCBI, où les génomes complets et annotés de chaque genre bactérien n'ont pas encore tous été recensés, *a fortiori* concernant les isolats marins.

Néanmoins, dans la majorité des cas, le génome associé aux séquences amplifiées par PCR appartenait au même genre bactérien, hormis pour les isolats *Rheinheimera* (AT1212), *Shewanella* (HE798), *Marinomonas* (MS937) et *Pseudoalteromonas* (MS941), dont les marqueurs nucléotidiques ont été assimilés à ceux des genres *Arthrobacter*, *Aeromonas* ou *Alteromonas*. Ces résultats sont vraisemblablement à nouveau liés à la faible représentation de ces micro-organismes marins dans la littérature, où seuls des génomes partiels de ces genres bactériens ont pour l'heure été ajoutés dans la base de données NCBI ; ainsi logiquement seuls les organismes les plus proches phylogénétiquement ont pu être affiliés.

D'autre part, les résultats BlastX permettant la recherche d'une protéine à partir d'une séquence nucléotidique préalablement convertie en séquence peptidique, ont été plus informatifs. A nouveau, les réponses 'hit Blast' proposées par la base de données NCBI Blast recherchant les protéines les plus semblables aux séquences d'intérêt, sont classées dans le **Tableau 07**.

Tout d'abord, aucune des 94 séquences amplifiées par le couple d'amorces PCR PHAsclf/r1 n'a pu être assimilée à la PHA synthase de type I. De surcroît, en dépit d'une amplification génique réalisée à partir des mêmes amorces PCR, aucune protéine similaire n'a été retrouvée entre les différentes souches. Enfin et à plusieurs reprises, les séquences issues d'un même isolat ont été rattachées à différentes protéines.

**Tableau 07.** Noms des souches et affiliations taxonomiques, correspondances BlastN/BlastX des produits PCR séquencés et pourcentages de similarité.

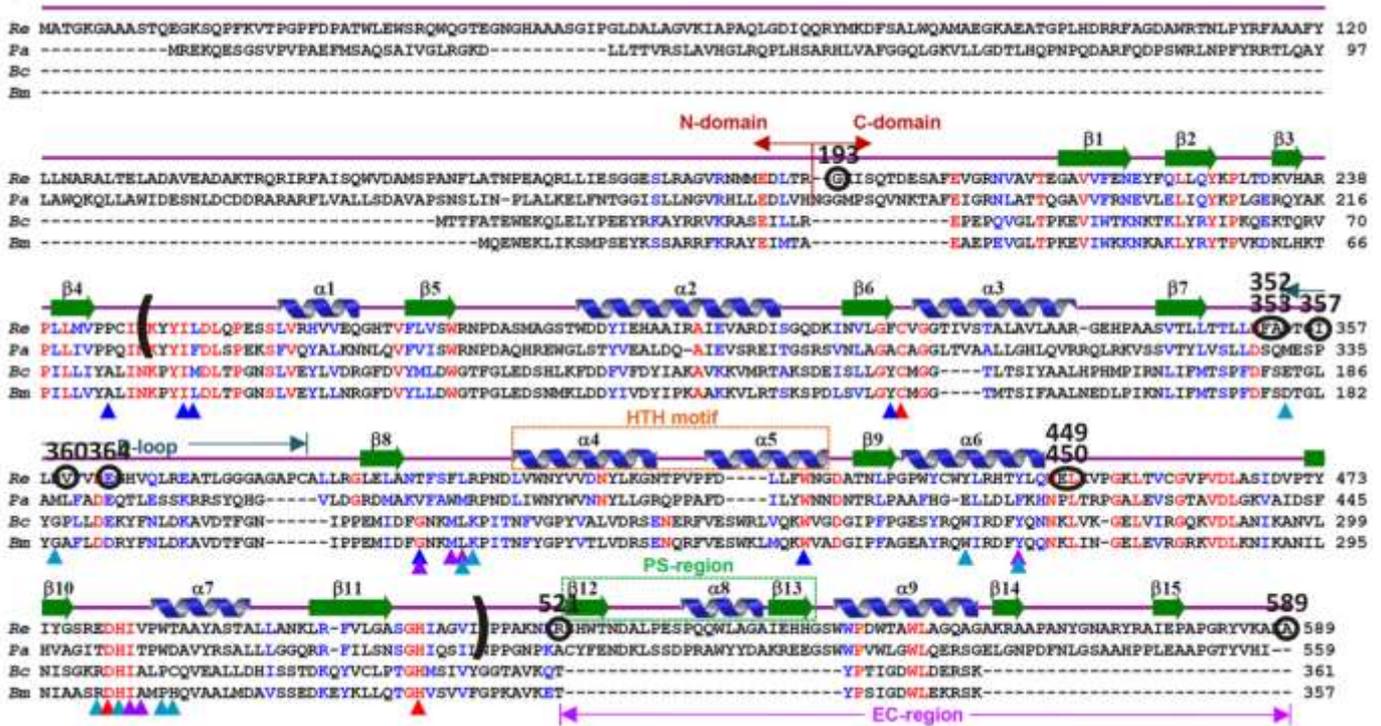
SOUCHE	TAXONOMIE	BLAST	GENES/PROTEINES AFFILIES	% SIMILARITE
AT1212	<i>Rheinheimera</i>	N	genome ( <i>Arthrobacter</i> )	4%
		X	N-acetyl-glucosamine ( <i>Rheinheimera</i> )	60% (x8)
AT1214	<i>Halomonas</i>	N	genome ( <i>Halomonas</i> )	73%
		X	nitrous oxide reductase ( <i>Halomonas</i> )	70% (x1)
			sulfur transferase ( <i>Halomonas</i> )	60% (x8)
AT1218	<i>Acinetobacter</i>	N	genome ( <i>Acinetobacter</i> )	78%
		X	cytochrome P450 ( <i>Acinetobacter</i> )	59% (x9)
AT1254	<i>Stenotrophomonas</i>	N	genome ( <i>Stenotrophomonas</i> )	77%
		X	N-acetylmuramate ligase ( <i>Psychrobacter</i> )	63% (x1)
			ABC permease ( <i>Stenotrophomonas</i> )	44% (x2)
BI725	<i>Alteromonas</i>	N	genome ( <i>Alteromonas</i> )	44%
		X	uracyl-methyltransferase ( <i>Vibrio</i> )	96% (x1)
			carboxylamine synthase ( <i>Alteromonas</i> )	29% (x1)
			cupin protein ( <i>Vibrio</i> )	25% (x4)
GY779	<i>Bacillus</i>	N	genome ( <i>Bacillus</i> )	90%
		X	urocanate hydratase ( <i>Bacillus</i> )	64% (x1)
			transcriptional antiterminator ( <i>Bacillus</i> )	62% (x4)
			cytosine permease ( <i>Bacillus</i> )	54% (x3)
			sorbitol deshydrogenase ( <i>Bacillus</i> )	35% (x1)
HE798	<i>Shewanella</i>	N	genome ( <i>Aeromonas</i> )	44%
		X	sigma factor ( <i>Shewanella</i> )	83% (x4)
			methyl-chemotaxis protein ( <i>Shewanella</i> )	78% (x2)
HE800	<i>Vibrio</i>	N	genome ( <i>Vibrio</i> )	83%
		X	glycine ligase ( <i>Vibrio</i> )	97% (x1)
			carboxylamine synthase ( <i>Vibrio</i> )	31% (x7)
MS937	<i>Marinomonas</i>	N	cloning vector	28%
		X	arylamine transferase ( <i>Marinomonas</i> )	58% (x9)
MS941	<i>Pseudoalteromonas</i>	N	genome ( <i>Alteromonas</i> )	78%
		X	cytidine acethyl transferase ( <i>Alteromonas</i> )	78% (x1)
			endonuclease ( <i>Alteromonas</i> )	77% (x1)
			NADP oxidoreductase ( <i>Alteromonas</i> )	76% (x3)
			chromosome protein ( <i>Alteromonas</i> )	32% (x4)
ST329	<i>Ruegeria</i>	N	plasmid ( <i>Ruegeria</i> )	93%
		X	dihydroxy-acid dehydratase ( <i>Rhodobacter</i> )	97% (x1)
			methyltransferase ( <i>Epibacterium</i> )	72% (x8)

Toutefois, alors que certaines séquences ont partagé un pourcentage de similitude supérieur à 90% avec des protéines connues, telles l'uracyl-méthyltransferase d'*Alteromonas*, la glycine ligase de *Vibrio* ou la dihydroxyacide déshydratase de *Ruegeria*, de nombreuses autres séquences du jeu de données ont affiché des taux de similarité inférieurs à 75% ou même 50%, et n'ont donc pas pu être affiliées avec certitude aux protéines 'hit Blast' proposées par la base de données.

De plus et de manière surprenante, les séquences nucléotidiques et peptidiques complètes et validées, relatives au gène *phaC* et à la protéine PhaC disponibles dans la base de données et ayant servi à l'élaboration des amorces PCR, ont également présenté des variations importantes. En effet, seuls des taux d'identité nucléotidique compris entre 40 et 50% ont été calculés par rapport au gène et à l'enzyme références de la souche *R. eutropha*.

Selon les travaux récents de Kim *et al.* (2017) et en dépit de cette forte hétérogénéité génique, un certain nombre d'acides aminés correspondant à des sites actifs et conservés, spécifiques de la PHA synthase de type I ont été mis en évidence : glycine G193, phénylalanine F352, alanine A353, isoleucine I357, valine V360, acides glutamiques E364 et E449, leucine L450, arginine R521 et alanine A589 (**Figure 33**). Or, l'alignement des 29 séquences nucléotidiques annotées, validées et utilisées pour la conception des amorces PCR PHAsclf/r1.r2 dessinées dans cette étude, pour cibler le gène codant la PHA synthase de type I, n'a pas permis de retrouver ces 10 acides aminés, mais uniquement les acides aminés F352, E/D364 et L450. Par ailleurs, l'analyse bioinformatique des produits PCR amplifiés à l'aide du couple d'amorces PHAsclf/r1 n'a pas permis d'isoler ces acides aminés conservés.

Ainsi, même s'il semble difficile de confirmer avec certitude l'affiliation des produits PCR à des catégories spécifiques de protéines révélées par BlastX, il convient d'affirmer que ceux-ci et en l'état, ne correspondent probablement pas non plus ni à l'enzyme PhaC, ni au gène d'intérêt *phaC*. **Malgré nos efforts et l'ensemble du travail accompli, nous ne sommes pas, à ce jour, en mesure de conclure quant à l'efficacité des amorces PHAscl et 4HB.**



**Figure 33.** Alignement des séquences nucléotidiques des PHA synthases de type I, II, III et IV.

D'après Kim et al., 2017.

Les cercles noirs entourent les acides aminés actifs et conservés sur la séquence protéique de la PHA synthase de type I chez *R. eutropha*. Les parenthèses délimitent la séquence protéique correspondant au fragment génique amplifié par les amorces PHAsclf/r de cette étude.

**Re** *R. eutropha* (PhaC I), **Pa** *P. aeruginosa* (PhaC II), **Bc** *B. cereus* (PhaC III) et **Bm** *B. megaterium* (PhaC IV).

## II. 3. 2. Production de copolymères de P(3HB4HB) par fermentation bactérienne à partir des souches révélées positives au criblage moléculaire

Durant ce travail de thèse, les expériences de criblage moléculaire, de production de copolymères par fermentation bactérienne et l'ensemble des analyses phylogénétiques ont été menées conjointement pendant près de 18 mois. Pour rappel, sur les **344 souches** mésophiles aérobies viables de la collection Ifremer-LM2E, **89 ont été criblées positives pour la recherche des gènes *phaC* et *4HBCoAt* par méthode moléculaire**, et donc jugées potentiellement capables de produire des PHA de type P(3HB4HB).

### II. 3. 2. 1. Production de copolymères de P(3HB4HB) selon un protocole de culture standardisé

Sur les **89 souches** considérées positives pour les gènes *phaC* et *4HBCoAt* lors de l'étape de criblage moléculaire, seuls **77 isolats** ont été cultivés par fermentation bactérienne pour la production du copolymère d'intérêt. Ces manquements s'expliquent par certains résultats de criblage PCR parvenus et traités tardivement, et des échéances temporelles à respecter.

Malgré cela, chacune des 77 souches a été cultivée pour initier la production de P(3HB4HB) suivant un protocole de culture standardisé en erlenmeyers de volume total 1,8 L, en présence de **5 g/L de glucose** et de **1,5 g/L de  $\gamma$ -hydroxybutyrate**. Les résultats moyens en matière de rendements, masses de cellules sèches et compositions des PHA obtenus en fonction du temps de fermentation et par souche sont rassemblés dans le **Tableau 08**.

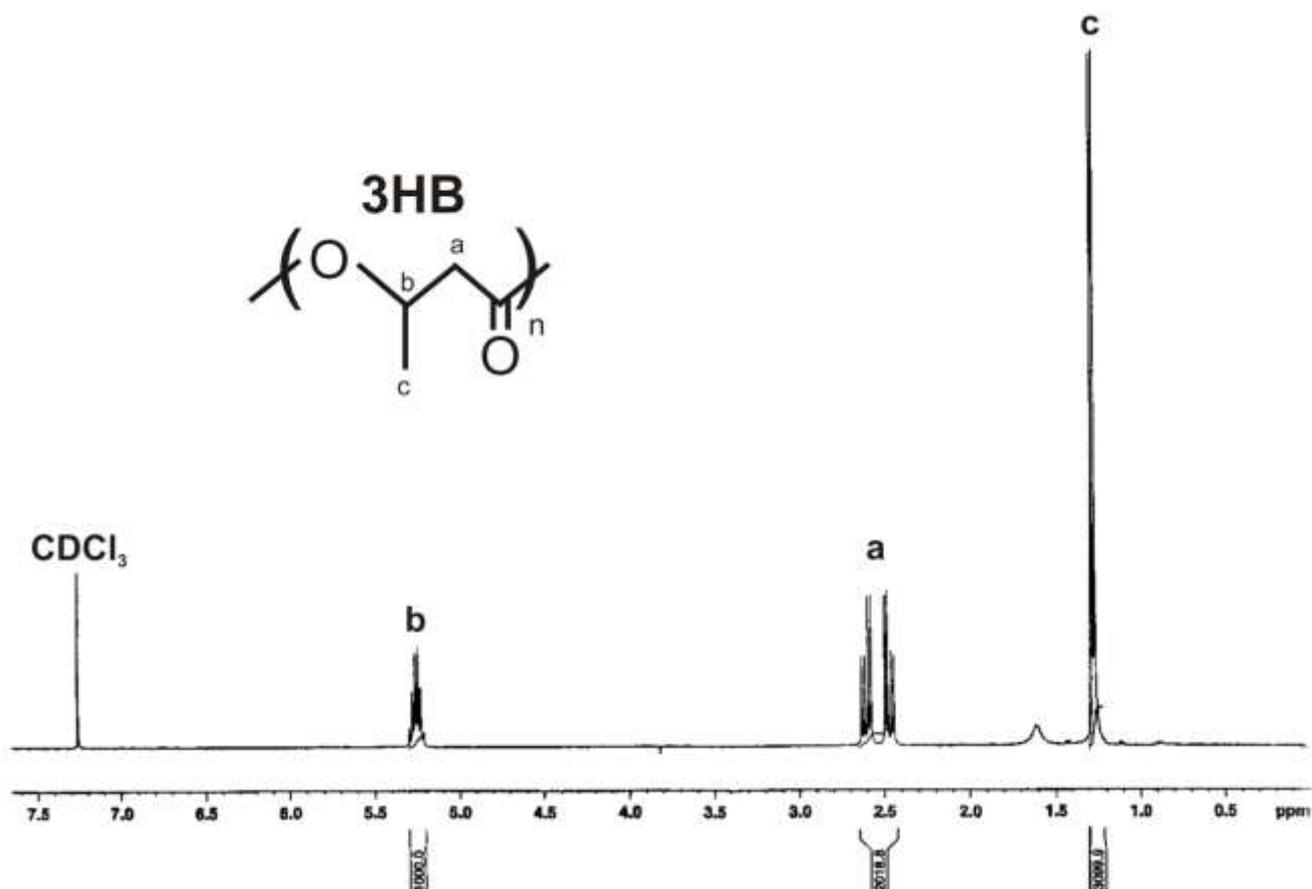
**Tableau 08.** Moyenne des rendements de PHA (en g/L et en g PHA/g masse cellules sèches), temps de fermentation (h), masses de cellules sèches (g/L) et compositions monomériques des PHA obtenus après fermentation cellulaire en présence de 5 g/L de glucose et 1,5 g/L de  $\gamma$ -HB.

(nd : non déterminé)

Souche	Genre bactérien	Espèce affiliée	Rendement PHA (g/L)	Temps ferment. (h)	Masse cellules sèches (g/L)	Rendement PHA (gPHA/gMCS)	Composition PHA (mol%)			
							3HB	4HB		
MS955	<i>Acinetobacter</i>	<i>venetianus</i>	0,22	48	1,07	0,21	99	1		
AT1218			0,03	48	0,63	0,05	100	0		
ST277	<i>Alteromonas</i>	<i>macleodii</i>	0,41	48	2,13	0,19	98	2		
ST279			0,01	70	0,80	0,01	-	-		
ST282			-	70	-	-	-	-		
ST283			-	70	-	-	-	-		
ST286			-	-	-	-	-	-		
ST308			-	70	-	-	-	-		
ST321			0,07	48	1,18	0,06	97	3		
ST334			-	70	-	-	-	-		
BI725			-	70	-	-	-	-		
HY755			0,01	70	0,81	0,01	96	4		
MA897			0,01	70	0,86	0,01	-	-		
HY756			<i>alvinellae</i>	-	70	-	-	-	-	
HY763				-	70	-	-	-	-	
ST340			<i>Halomonas</i>	<i>aquamarina</i>	0,57	48	1,25	0,46	99	1
ST345					0,01	48	0,23	0,04	94	6
ST347	0,49	70			0,92	0,53	95	5		
ST348	0,59	48			1,41	0,42	99	1		
ST350	0,99	48			1,75	0,57	99	1		
MS950	0,38	70			1,36	0,28	99	1		
AT1230	0,42	20			1,05	0,40	100	0		
ST269	0,46	70			1,43	0,32	97	3		
ST276	0,46	70			1,37	0,34	97	3		
ST310	<i>meridiana</i>	0,74			48	1,58	0,47	98	2	
BI729		0,55			48	1,23	0,45	97	3	
BI742		0,24			70	0,89	0,27	99	1	
AT1214	<i>profundus</i>	0,37			70	2,05	0,18	93	5	
PH1226		0,10			70	1,25	0,08	100	0	
AT1213		0,05			48	1,13	0,05	99	1	
AT1216		0,31	70	0,91	0,34	96	4			
AT1221		<i>titanicae</i>	0,15	96	1,33	0,11	100	0		
AT1229			0,36	70	0,98	0,37	95	5		
AT1233	0,43	48	1,19	0,36	88	12				
MS937	<i>Marinomonas</i>	<i>communis</i>	-	48	-	-	-	-		
MS996			-	48	-	-	-	-		
MS999			-	48	-	-	-	-		
MS941	<i>Pseudoalteromonas</i>	<i>haloplanktis</i>	-	-	-	-	-	-		
MS951			-	48	-	-	-	-		
MS1006			-	-	-	-	-	-		
AT1212	<i>Rheinheimera</i>	<i>aquimaris</i>	0,08	48	1,09	0,08	100	0		
ST329	<i>Ruegeria</i>	sp.	0,16	48	1,51	0,11	100	0		
HE798	<i>Shewanella</i>	<i>algae</i>	0,23	70	1,57	0,15	100	0		
ST719	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus</i>	-	48	-	-	-	-		
AT1254	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>maltophila</i>	-	48	-	-	-	-		

Souche	Genre bactérien	Espèce affiliée	Rendement PHA (g/L)	Temps ferment. (h)	Masse cellules sèches (g/L)	Rendement PHA (gPHA/gMCS)	Composition PHA (mol%)	
							3HB	4HB
ST298			0,15	48	1,43	0,11	99	1
ST299			0,14	20	0,98	0,14	90	10
ST300			0,14	48	1,02	0,14	99	1
ST302			0,14	48	1,09	0,13	98	2
ST314		sp.	0,11	48	0,96	0,11	98	2
ST315			0,26	48	1,31	0,20	97	3
ST330			0,26	48	1,48	0,18	97	3
ST331			0,22	48	1,16	0,19	99	1
GY795			-	-	-	-	-	-
MS983			0,15	48	1,32	0,12	100	0
ST320			0,13	48	1,28	0,13	100	0
MS973			0,01	48	1,26	0,08	100	0
MS978		<i>alginoliticus</i>	0,02	24	0,95	0,02	100	0
MS979			0,01	48	1,07	0,02	100	0
MS982			0,05	48	1,17	0,05	100	0
MS1007		<i>algoinfesta</i>	0,02	20	0,79	0,02	100	0
HE799		<i>diabolicus</i>	0,05	24	1,19	0,05	98	2
HE800			0,35	4,5	1,86	0,19	100	0
ST395	<i>Vibrio</i>	<i>neocaledonicus</i>	0,09	48	1,28	0,07	98	2
HE801			-	70	-	-	-	-
MA891			0,07	24	1,14	0,06	97	3
MA893			0,06	48	1,32	0,05	99	1
MS977			0,01	24	1,10	0,01	100	0
MS980			0,10	48	1,22	0,08	100	0
MS981			0,15	48	1,34	0,11	100	0
MS984			0,03	48	1,22	0,03	99	1
MS986			0,02	24	1,27	0,02	99	1
MS988		<i>parahaemolyticus</i>	0,03	24	1,25	0,02	99	1
MS989			0,09	24	1,06	0,09	100	0
MS990			0,03	48	0,82	0,04	100	0
MS991			0,04	48	1,04	0,04	100	0
MS992			0,08	48	1,26	0,06	100	0
MS994			0,04	48	0,81	0,06	100	0
MS1001			0,05	48	1,25	0,04	100	0
MS1002			0,02	20	1,12	0,02	100	0
MS1005			0,02	20	1,09	0,02	100	0
ST273			-	-	-	-	-	-
ST288			-	-	-	-	-	-
ST316			-	-	-	-	-	-
ST318	<i>NC</i>	<i>nc</i>	-	-	-	-	-	-
ST416			-	-	-	-	-	-
GY767			-	-	-	-	-	-
MS896			-	-	-	-	-	-
MS906			-	-	-	-	-	-

Sur les 77 souches testées, **63 soit 82% des isolats** ont produit un extrait chloroformique dans les conditions de culture standardisées appliquées, et ce au bout de 5 à 70 h de processus de fermentation. Par ailleurs, l'analyse de ces extraits par RMN  $^1\text{H}$  a confirmé la présence de PHA à courtes chaînes, à l'image du spectre du **P(3HB)** présenté en **Figure 34**, caractérisé par un pic à 5,24 ppm correspondant au CH (b), un double signal à 2,58 et 2,44 ppm relatif au CH<sub>2</sub> (a), et un dernier signal à 1,25 ppm lié au groupement CH<sub>3</sub> de la chaîne latérale (c).

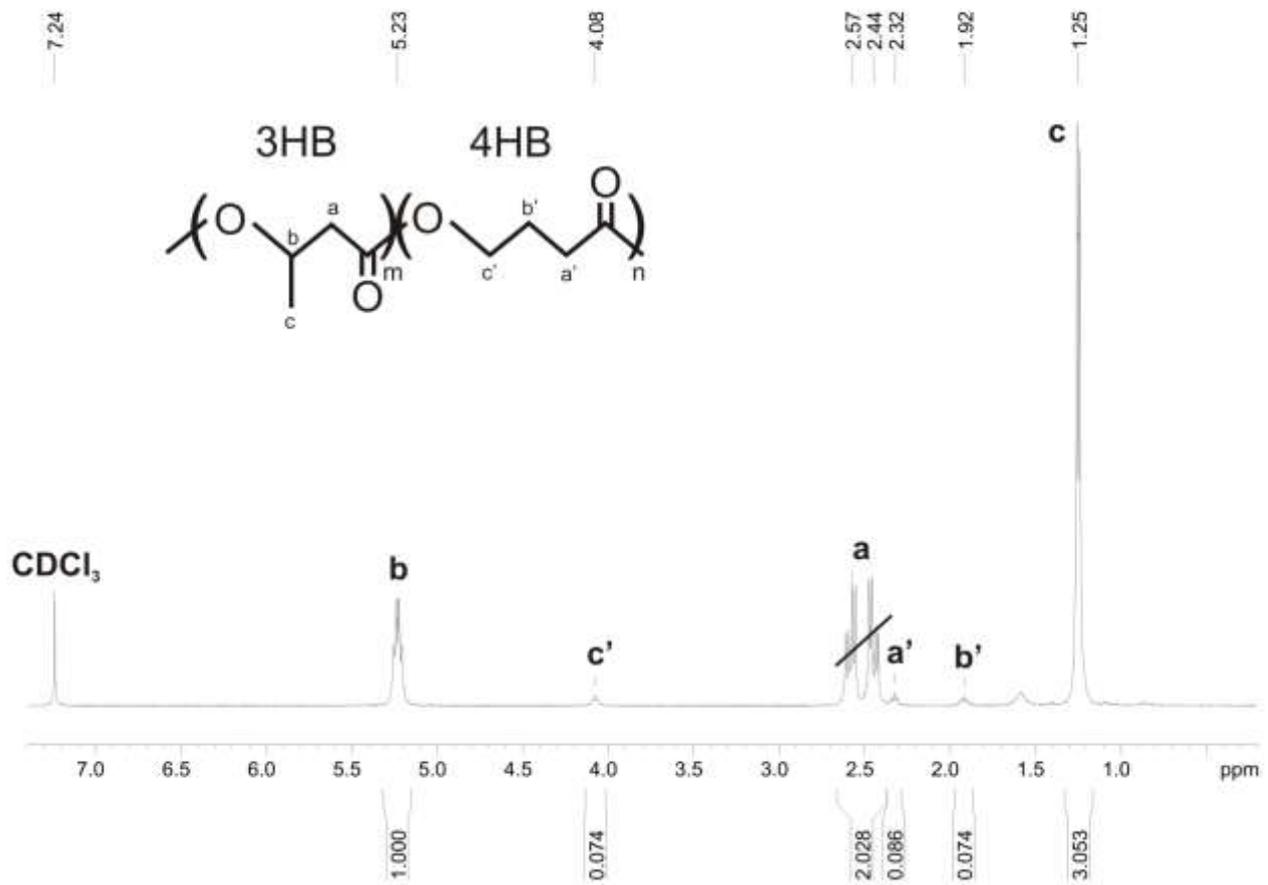


**Figure 34.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du P(3HB), produit par la souche AT1214 en présence de 5 g/L de glucose.

De plus, parmi les 63 souches ayant produit un PHA à courtes chaînes durant cette phase de culture standardisée, **32 isolats (51%)** ont synthétisé du **P(3HB4HB)**. Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de ces échantillons font apparaître les signaux caractéristiques du motif 3HB, ainsi que trois signaux complémentaires à 4,09, 2,34 et 1,93 ppm, correspondant aux groupements CH<sub>2</sub> de l'unité 4HB (**Figure 35**). Le ratio de 4HB au sein de ces polymères a été

calculé grâce aux intégrations des différents protons selon la formule

$$= 100 - \frac{100 \times Ib}{1000 + ((Ia' + Ib' + Ic')/6)}$$



**Figure 35.** Spectre RMN  $^1\text{H}$  du copolymère de P(3HB4HB $_{4\%}$ ) synthétisé par la souche AT1233, en présence de 5 g/L de glucose et 1,5 g/L de  $\gamma$ -hydroxybutyrate (4M).

Au vu des résultats obtenus suite à ces expériences de fermentation *via* un protocole de culture standardisé, de fortes disparités en matière de capacités de production de PHA à courtes chaînes ont été observées, avec des **rendements compris entre 10 et près de 570 mg de polymères purifiés par gramme de masse cellulaire sèche** selon les souches. Quant aux 32 souches ayant synthétisé du P(3HB4HB), des **taux d'unités 4HB compris entre 1 et 12% ont été calculés**.

Le même protocole de culture standardisé a été appliqué aux 77 isolats bactériens, à l'exception de la durée d'incubation qui a été ajustée en fonction des observations microscopiques. Celles-ci ont permis d'apprécier la viabilité des cellules et le taux

d'accumulation maximal de PHA. Les résultats obtenus dans cette étude semblent indiquer que les micro-organismes expriment des **schémas d'accumulation de P(3HB) ou de P(3HB4HB) différents** selon leur positionnement taxonomique.

Ainsi, les isolats appartenant au genre *Vibrio* accumulent un maximum de PHA en seulement quelques heures, avant de ne vraisemblablement recon sommer ceux-ci tout aussi rapidement pour subvenir à leurs besoins énergétiques (Chien *et al.*, 2007; Sasidharan *et al.*, 2015). Plus particulièrement, la souche HE800 *V. diabolicus* polymérise près de 200 mgPHA/gMCS en 4h30, alors que d'autres micro-organismes du même genre bactérien affichent un rendement moyen inférieur à 100 mgPHA/gMCS au bout de 20 à 48 h de culture.

D'autres souches, notamment celles affiliées au genre *Halomonas*, nécessitent près de trois jours de processus de fermentation avant d'atteindre une accumulation maximale de PHA. Celles-ci représentent par ailleurs la catégorie de micro-organismes la plus productive au sein de la population étudiée, avec des quantités de PHA synthétisées de l'ordre de 350 mgPHA/gMCS.

Concernant les autres genres bactériens (*Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Rheinheimera*, *Ruegeria* et *Shewanella*), le temps d'accumulation intracellulaire maximal de polymère n'a pas pu être évalué pour chaque souche, même si la période d'incubation idéale semble se situer aux alentours de 48 h de fermentation.

D'autre part, **32 souches** issues de la collection Ifremer-LM2E ont produit des copolymères de **P(3HB4HB)**. Les analyses taxonomiques ont permis de classer ces souches au sein de quatre genres bactériens : *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Halomonas* et *Vibrio*. Les meilleurs rendements et ratios d'unités 4HB ont à nouveau été obtenus avec les micro-organismes appartenant au genre *Halomonas*, avec plusieurs centaines de milligrammes de copolymères par litre de milieu de culture et un taux maximal de 4HB de l'ordre de 12% (AT1233).

De manière générale, le protocole de culture standardisé appliqué dans le cadre de ces travaux a permis la **production de PHA à courtes chaînes** chez la majorité des souches testées (**82%**), y compris à partir de micro-organismes appartenant aux genres bactériens

*Alteromonas* (ST277, ST279, ST321, HY755 et MA897), *Rheinheimera* (AT1212) et *Ruegeria* (ST329), pour lesquels la capacité de synthèse de PHA n'avait encore **jamais été démontrée**. **De plus, il s'agit ici de la première étude prouvant les aptitudes de production de copolymères de P(3HB4HB) à partir de bactéries natives associées aux environnements marins profonds.**

En revanche, la mise en culture de 14 autres souches positives au criblage moléculaire des gènes *phaC* et *4HBCoAt* n'a pas permis de produire de PHA dans les conditions expérimentales testées (ST282, ST283, ST308, ST334, ST719, BI725, HY756, HY763, HE801, MS937, MS951, MS996, MS999 et AT1254). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat.

En premier lieu, **la méthode de criblage moléculaire par PCR**, dont l'objectif était de couvrir une part importante de la biodiversité marine à l'aide d'amorces fortement dégénérées pour la recherche des gènes *phaC* de type I et *4HBCoAt*, a vraisemblablement conduit à l'obtention de résultats erronés, et par conséquent à la sélection d'isolats positifs malgré l'absence des gènes *phaC* et *4HBCoAt*. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats observés chez les souches MS937, MS996 et MS999, appartenant au genre *Marinomonas* et pour lequel aucune étude scientifique n'a à ce jour démontré une quelconque capacité de synthèse de PHA, alors que des produits PCR amplifiés à l'aide des amorces PHAsclf/r et 4HBf/r ont été détectés dans le cadre de cette étude (**Tableau 06**).

D'autres hypothèses liées **aux conditions de culture** peuvent également justifier l'absence de production de PHA. En effet, l'ensemble des fermentations a été réalisé selon un protocole applicable à un grand nombre d'isolats dans des conditions expérimentales simples, standardisées et non optimisées (T = 34°C, pH = 7,6 unités, [NaCl] = 20 g/L, [Glucose] = 5 g/L et [ $\gamma$ -hydroxybutyrate] = 1,5 g/L). Il est probable que certains paramètres expérimentaux n'aient pas permis la biosynthèse de PHA et leur accumulation chez certaines bactéries, notamment en raison de la **nature** de la ou des source(s) carbonée(s) utilisée(s) comme précurseur(s) et/ou des **concentrations** administrées. En effet, même si la production de P(3HB4HB) a été induite avec succès en présence de glucose et de  $\gamma$ -hydroxybutyrate au cours de ce travail, des études récentes ont démontré que le glucose n'est pas un substrat universel en matière de synthèse de PHA à courtes chaînes. Plusieurs

représentants bactériens affiliés aux genres *Bacillus* ou *Streptomyces* semblent en effet privilégier les voies énergétiques impliquant le glycérol (Valappil *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009). De la même façon, le  $\gamma$ -hydroxybutyrate (1,5 g/L) utilisé comme précurseur pour la synthèse de monomères de 4HB peut ne pas convenir à certaines souches qui préféreront d'autres sources carbonées tels le 1,4-butanediol, le 4-chlorobutyrate ou la  $\gamma$ -butyrolactone (Steinbüchel and Lütke-Eversloh, 2003; Lee *et al.*, 2004). De plus, le  $\gamma$ -hydroxybutyrate présent même en quantité limitée, peut s'avérer toxique pour certaines cellules et déclencher un état de stress incompatible avec la production de PHA, tel que nous avons pu l'observer par microscopie pour certains micro-organismes présentant une morphologie cellulaire modifiée, voire une mortalité élevée.

D'autres études ont montré que **certaines éléments de type fer, magnésium ou cuivre** sont nécessaires à la production de PHA pour de nombreux genres bactériens, notamment en tant que cofacteurs protéiques (Ramsay *et al.*, 1990; Passanha *et al.*, 2013). Certains de ces composés ont donc pu manquer dans le milieu de culture appauvri utilisé dans le cadre de notre étude.

Ces quelques raisons imputées au milieu de culture standardisé peuvent expliquer, au moins en partie, l'absence de production de PHA à partir des souches MS941, ST719 et AT1254. Ces trois micro-organismes appartiennent pourtant respectivement aux genres bactériens *Pseudoalteromonas*, *Staphylococcus* et *Stenotrophomonas*, pour lesquels la synthèse de PHA a d'ores et déjà été décrite dans la littérature (Valappil *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010; Iqbal *et al.*, 2016).

D'autre part, certains auteurs défendent également le **rôle inhibiteur** des protéines de régulation de type **PhaR**, en mesure d'inhiber la transcription des gènes liés à la biosynthèse des PHA (**Figure 05**). Ces protéines répressives empêchent la production bactérienne de PHA dans certaines conditions culturelles particulières, même si les mécanismes et contextes d'activation restent à ce jour mal compris (Maehara *et al.*, 2002; Pötter *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2014).

Enfin, de récentes études plébiscitent l'importance du processus de **transfert horizontal de gènes (THG)** dans le mécanisme de biosynthèse des PHA, entre micro-organismes de genres bactériens différents ou même inter-espèces (Kalia *et al.*, 2007;

Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2017). Ce phénomène évolutif fréquent expliquerait pourquoi deux individus bactériens différents, appartenant néanmoins au même genre taxonomique voire à la même espèce, ne partageraient pas exactement les mêmes fonctions métaboliques, en l'occurrence ici à cause de l'intégration génomique partielle voire insuffisante des gènes nécessaires à la synthèse de PHA au fil des divisions cellulaires. A plus large échelle, le transfert horizontal de gènes est reconnu comme commun, fréquent, et surtout nécessaire à la survie des micro-organismes, et *a fortiori* chez ceux colonisant les milieux extrêmes, où l'adaptation aux brusques changements environnementaux se doit d'être particulièrement réactive (de la Cruz and Davies, 2000; Thomas and Nielsen, 2005; Zhang *et al.*, 2017).

Ainsi, ces quelques hypothèses peuvent apporter un début de réponse quant au fait que les isolats ST282, ST283, ST308, ST334, BI725, HY756 et HY763, pourtant tous classés parmi les *Alteromonas*, n'ont pas produit de PHA dans les conditions de culture standardisées de l'étude, alors même que les souches ST277, ST279, ST321, HY755 et MA897 tout autant apparentées à l'espèce *A. macleodii* et isolées dans les mêmes zones géographiques, ont démontré une capacité de synthèse de PHA à courtes chaînes, et même de copolymères de P(3HB4HB). De la même manière, la souche ST716 également issue de la collection Ifremer-LM2E et affiliée à l'espèce *A. macleodii* par Raguenes *et al.* (1996), avait été décrite à l'époque comme non productrice de PHA.

En conclusion, toutes ces hypothèses relatives à la durée de fermentation, la toxicité potentielle du  $\gamma$ -hydroxybutyrate, la carence en éléments minéraux dans le milieu de culture, l'action de protéines inhibitrices ou le phénomène de transfert horizontal de gènes peuvent expliquer l'absence de production de PHA chez certaines souches.

Malgré ces incertitudes, **plus de 80% des isolats criblés positifs par la méthode moléculaire PCR ont conduit à la synthèse de PHA à courtes chaînes**, selon le protocole de culture standardisé établi, et notamment à partir de micro-organismes appartenant aux genres bactériens *Alteromonas* (ST277, ST279, ST321, HY755 et MA897), *Rheinheimera* (AT1212) et *Ruegeria* (ST329), pour lesquels la capacité à synthétiser des PHA est décrite pour la première fois.

De plus, **32 souches ont synthétisé des copolymères de P(3H4HB) à des rendements compris entre 10 et 570 mgPHA/gMCS, et des ratios de 4HB entre 1 et 12%**, mettant ainsi en lumière les capacités de production de P(3HB4HB) à partir de bactéries natives, associées aux environnements hydrothermaux profonds.

### II. 3. 2. 2. Essai d'optimisation de la production de copolymères de P(3HB4HB)

Les **neuf souches** ayant produit un copolymère de P(3HB4HB) à des ratios de 4HB supérieurs à 5% selon le protocole de culture standardisé ont été sélectionnées pour une seconde étape de fermentation au cours de laquelle nous avons étudié plusieurs sources de carbone, seules ou en mélange, et en concentrations variables, afin de tenter d'améliorer les rendements de production et les taux d'unités 4HB.

Les milieux de culture ont ainsi été supplémentés en glucose, glycérol,  $\gamma$ -hydroxybutyrate ou 1,4-butanediol en concentrations variables, au cours de cultures réalisées en erlenmeyers et en bioréacteurs. Les données relatives aux différentes expériences menées sur les souches ST347, AT1214, AT1216, AT1221, PH1226, AT1229, AT1233 (*Halomonas*), ST299 et HE800 (*Vibrio*) sont regroupées dans le **Tableau 09**.

D'une manière générale, ces nouvelles cultures en erlenmeyers n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs rendements de P(3HB4HB), qui sont restés en moyenne inférieurs à 150 mgPHA/gMCS pour les représentants du genre *Halomonas*, et tout aussi faibles pour les deux souches de *Vibrio*.

Il n'a pas non plus été obtenu de taux significativement plus élevés d'unités 4HB par rapport aux cultures standardisées réalisées en présence de 5 g/L de glucose et de 1,5 g/L de  $\gamma$ -hydroxybutyrate. De surcroît, les fermentations menées en bioréacteurs n'ont pas permis de produire plus de copolymères qu'en erlenmeyers, malgré l'ajustement automatique du pH empêchant l'acidification du milieu, et l'oxygénation homogène de la cuve.

**Tableau 09.** Rendements et ratios de 4HB en fonction du mode de culture, de la durée de fermentation et des sources carbonées. *Glu* : glucose, *Gly* : glycérol, *1,4but* : 1,4-butanediol.

Souche	Genre bactérien	Espèce affiliée	Erlen 1,8L Bioréacteur 3,5L	Temps ferment. (h)	Sources Carbonées	Rendement PHA (g/L)	Rendement PHA (gPHA/gMCS)	Ratio 4HB (%)	
ST347	<i>Halomonas</i>	<i>aquamarina</i>	E	7	5g Glu+2g 4HB	0,09	0,13	3,5	
				48	5g Glu+1.5g 4HB	0,32	0,12	1	
				48	5g Glu+2g 4HB	0,35	0,38	0	
				70	5g Glu+2g 4HB	0,45	0,49	0	
AT1214	<i>Halomonas</i>	<i>profundus</i>	B	48	10g Glu+10g 4HB	0,19	0,15	3	
					5g Glu+2 g 1,4but	0,12	0,11	3	
					5g Glu+2 g 1,4but	0,09	0,05	3	
					5g Glu+2 g 1,4but	0,55	0,31	1	
					5g Glu+2 g 1,4but	0,29	0,23	3	
					5g Gly+2 g 1,4but	0,02	0,02	0	
					1g 4HB	0,00	0,00	0	
				5g 4HB	0,00	0,00	0		
				70	5g Glu+2g 4HB	0,37	0,16	5	
					7g Glu+3g 4HB	0,29	0,23	2	
					5g Glu+5g 4HB	0,31	0,18	3	
					10g Glu+5g 4HB	0,26	0,18	3	
					10g Glu+5g 4HB	0,33	0,15	0	
					10g Glu+10g 4HB	0,31	0,20	0	
10g Glu+15g 4HB	0,01	0,01	1						
96	10g Glu+15g 4HB	0,09	0,07	0					
	5g Glu+1g 4HB	0,04	0,04	0					
	5g Glu+2g 4HB	0,15	0,09	0					
	5g Glu+2g 4HB	0,13	0,26	5					
	5g Glu+2g 4HB	0,15	0,09	5					
	5g Glu+2g 4HB	0,14	0,09	0					
PH1226	<i>Halomonas</i>		B	96	5g Glu+2g 4HB	0,07	0,01	0	
					5g Glu+2g 4HB	0,03	0,02	0	
AT1216	<i>Halomonas</i>			E	20	5g Glu+1,5g 4HB	0,15	0,09	4
					24	5g Glu+2g 4HB	0,40	0,25	3
				B	48	5g Glu+2g 4HB	0,44	0,26	3
					72	5g Glu+2g 4HB	0,90	0,28	3
AT1221	<i>Halomonas</i>		B	96	5g Glu+2g 4HB	0,03	0,03	0	
					5g Glu+2g 4HB	0,08	0,06	0	
					5g Glu+2g 4HB	0,09	0,06	0	
AT1229	<i>Halomonas</i>	<i>titanicae</i>	E	7	5g Glu+2g 4HB	0,12	0,18	3	
				48	5g Glu+1,5g 4HB	0,18	0,21	5	
				48	5g Glu+2g 4HB	0,22	0,24	1	
				70	5g Glu+2g 4HB	0,29	0,30	0	
AT1233	<i>Halomonas</i>			E	20	5g Glu+1g 4HB	0,16	0,17	4
					20	5g Glu+1,5g 4HB	0,29	0,50	5,5
					48	5g Glu+1g 4HB	0,34	0,32	3,5
				B	48	5g Glu+2g 4HB	0,24	0,22	5
					24	5g Glu+2g 4HB	0,16	0,14	1
					48	5g Glu+2g 4HB	0,23	0,18	1
					72	5g Glu+2g 4HB	0,55	0,18	1
ST299	<i>Vibrio</i>	<i>sp.</i>	E	7	5g Glu+2g 4HB	0,15	0,10	2	
				20	5g Glu+1,5g 4HB	0,09	0,09	0	
				48	5g Glu+2g 4HB	0,04	0,07	1	
HE800	<i>Vibrio</i>	<i>diabolicus</i>	E	48	5g Glu+2g 4HB	0,02	0,01	0	
				4.5	5g Glu+2g 4HB	0,24	0,13	0	
			B	24	5g Glu+2g 4HB	0,01	0,01	0	
				48	5g Glu+2g 4HB	0,03	0,03	0	

Au contraire, l'apport de concentrations supérieures à 5 g/L de glucose ou de 4HB a plutôt diminué les rendements de copolymères et ratios de 4HB néosynthétisés (souche AT1214). Parallèlement, ces résultats indiquent que le glucose est un **co-substrat** nécessaire au  $\gamma$ -hydroxybutyrate pour la synthèse de copolymères de P(3HB4HB), puisque le 4HB utilisé comme unique source de carbone n'aboutit pas à la synthèse de PHA, et sembler provoquer une lyse rapide des cellules. Par ailleurs, l'utilisation d'autres sources carbonées telles que le glycérol ou le 1,4-butanediol n'a pas non plus permis d'augmenter les rendements de production ou les ratios de 4HB de manière significative.

S'agissant plus précisément des cultures menées en bioréacteurs, il est possible que les forces de cisaillement provoquées par les pales de l'axe de rotation central aient altéré les cellules. En effet, ce système d'agitation intrusif couplé à l'émission continue de bulles d'air directement dans le milieu de culture peut créer un environnement défavorable, pouvant expliquer les rendements plus faibles qu'en erlenmeyers. L'usage d'axes de rotation à pales elliptiques, employés pour assurer l'homogénéisation du milieu de façon moins brutale, pourrait permettre de limiter ces forces de cisaillement.

Ces multiples expériences ont par ailleurs permis de confirmer que les concentrations en sources carbonées optimales pour la synthèse de copolymères de **P(3HB4HB)** sont de **5 g/L de glucose** et **1,5 à 2 g/L de  $\gamma$ -hydroxybutyrate**. De la même façon, nous avons confirmé une nette variabilité au niveau de la vitesse de biosynthèse des PHA selon les micro-organismes, avec un rendement maximal de PHA atteint en **moins de 20 h** avec les isolats appartenant au genre de *Vibrio*, et **entre trois et quatre jours** pour les espèces du genre *Halomonas*.

En conclusion, l'éclectisme des résultats obtenus lors de cette étude tend à rappeler que les cultures réalisées à partir de micro-organismes bactériens ne sont reproductibles que dans une certaine mesure. En effet, il n'a pas été possible d'identifier une bactérie en particulier, capable de produire des quantités élevées de copolymères de P(3HB4HB), dont le ratio d'unités 4HB aurait pu être ajusté en modulant la concentration des sources carbonées dans le milieu, et ce malgré de nombreuses expérimentations de mise en culture. Il est néanmoins opportun d'indiquer qu'au vu des résultats obtenus lors cette étude, les souches appartenant à un même genre, voire à une même espèce bactérienne, présentent des

capacités de synthèse de PHA, en termes de temps d'accumulation optimal et de quantités stockées, relativement proches.

**Malgré les difficultés rencontrées, cette étude originale décrit pour la première fois, la capacité d'isolats bactériens natifs isolés au niveau d'environnements marins extrêmes à produire des PHA de type P(3HB4HB) en conditions de laboratoire.**

Les copolymères de P(3HB4HB) produits en quantité exploratoire durant cette première partie de thèse seront utilisés en tant qu'échantillons pour l'élaboration de nanoparticules à visée thérapeutique, au cours de la seconde partie de ces travaux, menés à l'ICMPE.

### **II. 3. 3. Exploration de la biodiversité bactérienne productrice de PHAscl associée aux environnements marins profonds**

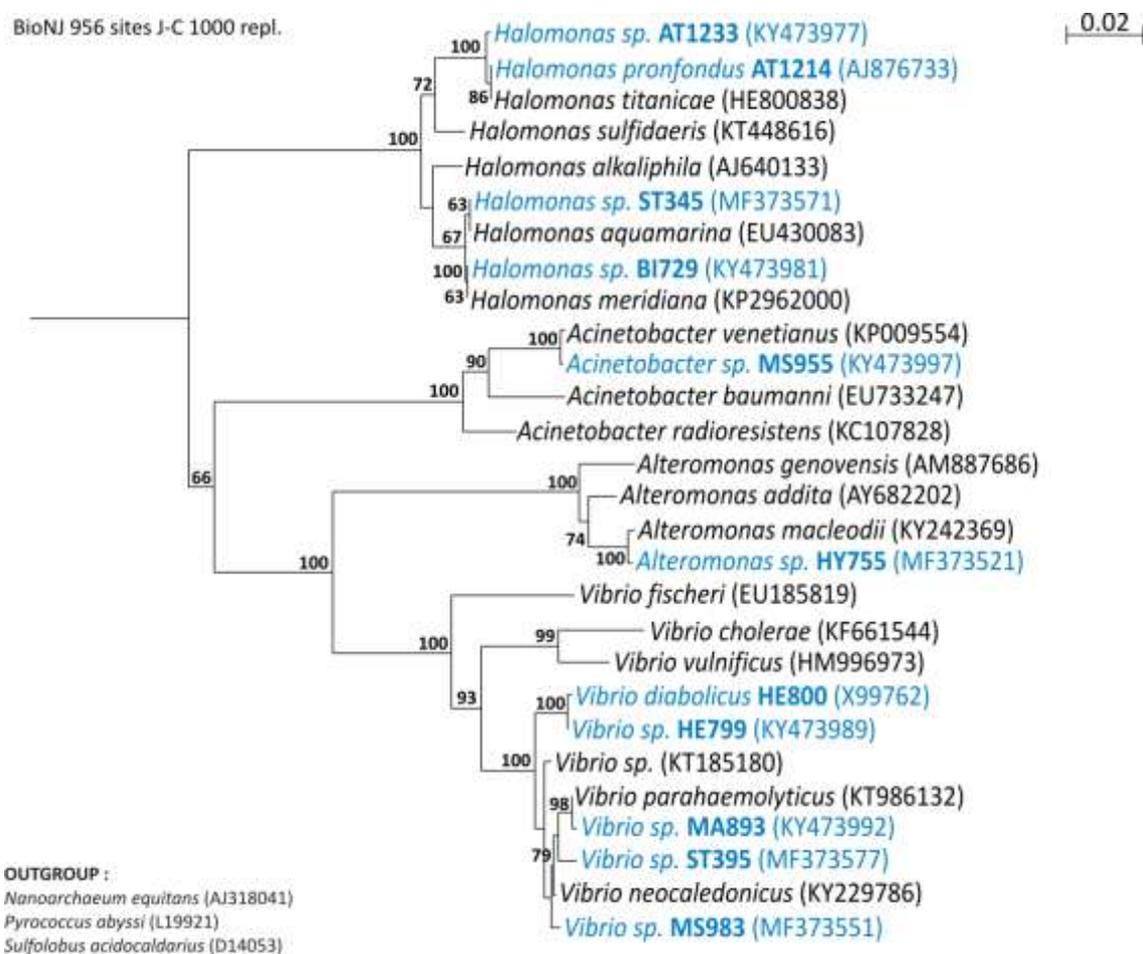
Le dernier objectif de cette première partie de thèse visait à explorer la diversité microbienne des environnements marins profonds, en particulier celle capable de produire des PHA à courtes chaînes. Pour ce faire, des analyses phylogénétiques ont été effectuées par séquençage du gène marqueur universel codant l'ARNr 16S, afin d'accéder à la classification taxonomique de ces micro-organismes bactériens.

#### **II. 3. 3. 1. Analyse phylogénétique des souches bactériennes productrices de copolymères de P(3HB4HB)**

L'arbre phylogénétique présenté en **Figure 36** répertorie les isolats ayant produit un PHA de type **P(3HB4HB)**. A l'origine au nombre de 32, seules les souches références de chaque espèce ont été intégrées, afin d'éviter un encombrement inutile de l'arbre. Les souches références ont été choisies d'après leur séquence nucléotidique, en particulier

celles présentant un taux de similarité supérieur à 99% par rapport à leurs homologues, et un nombre de nucléotides élevé permettant la construction d'un arbre robuste.

Ce premier arbre phylogénétique rassemble quatre genres bactériens (*Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Halomonas* et *Vibrio*), appartenant tous au phylum des  $\gamma$ -protéobactéries. Malgré le séquençage partiel des ARNr 16S ( $\approx 1000/1450$  pb), il a été possible d'affilier l'ensemble des souches de la collection Ifremer-LM2E à des espèces bactériennes décrites et déposées dans la base de données NCBI, avec des taux de similarité nucléotidique supérieurs à 97%.



**Figure 36.** Position phylogénétique des souches bactériennes productrices de copolymères de P(3HB4HB), établie d'après les séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S. (Les souches références sont en bleu et les numéros d'accèsion GenBank entre parenthèses. Les valeurs bootstrap >50% ne sont pas indiquées, l'échelle représente 0,02 substitution par séquence.)

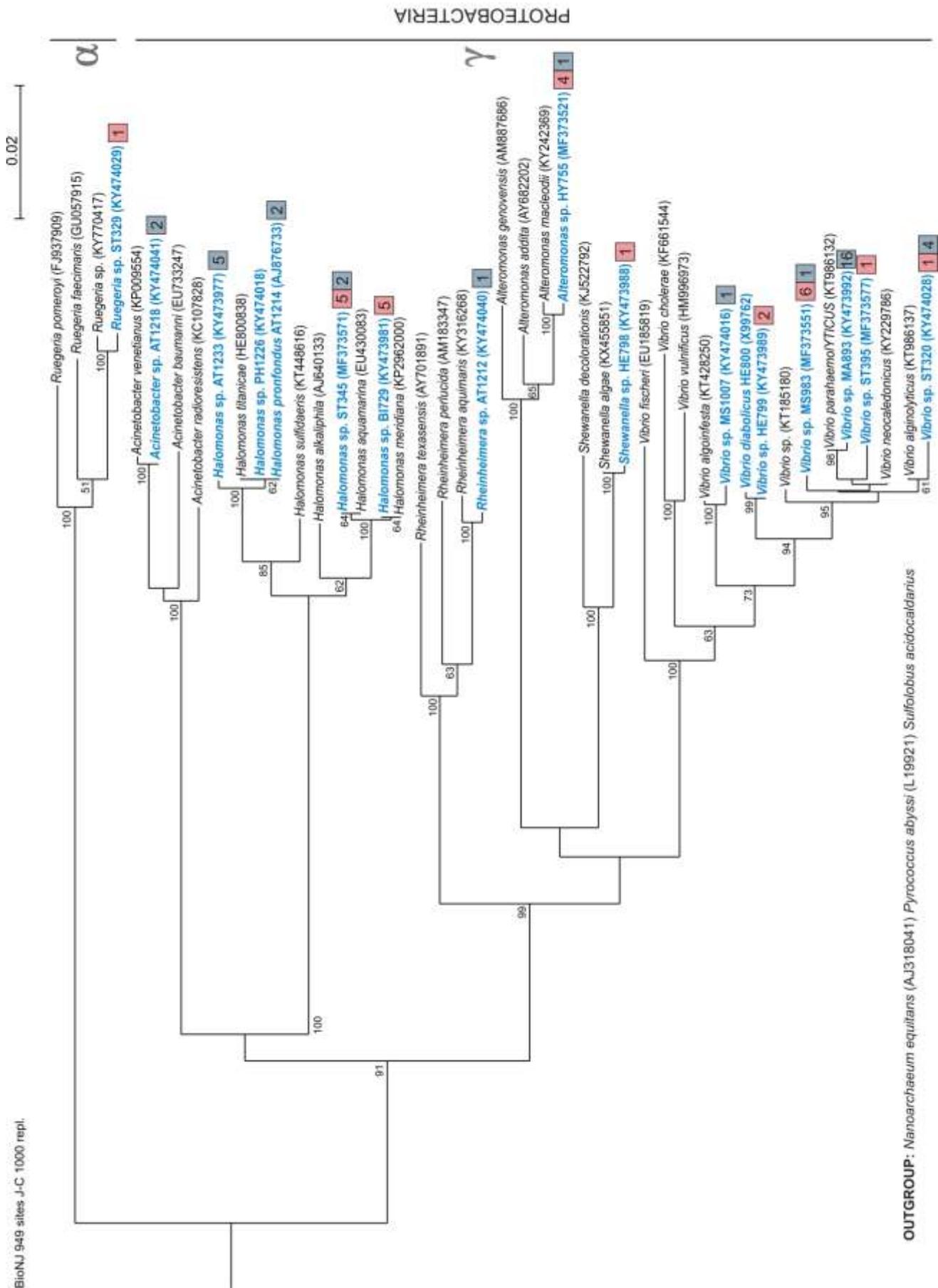
Cette première analyse taxonomique met en évidence la diversité des espèces capables de produire ces copolymères de P(3HB4HB) en conditions de laboratoire, avec des représentants affiliés à une espèce d'*Acinetobacter*, une autre d'*Alteromonas*, quatre de la famille des *Halomonas*, et trois autres du genre *Vibrio*.

### II. 3. 3. 2. Analyse phylogénétique des souches bactériennes productrices de PHAscl

La Figure 37 représente l'arbre phylogénétique des 63 souches bactériennes ayant produit un polymère de type PHA à courtes chaînes. Sept genres bactériens  $\gamma$  sont représentés (*Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Halomonas*, *Rheinheimera*, *Ruegeria*, *Shewanella* et *Vibrio*), divisés en deux phyla, ceux des  $\alpha$  et  $\gamma$ -protéobactéries.

Une nouvelle fois, cette étude d'exploration est la première à référencer une telle biodiversité bactérienne capable de produire des PHA à courtes chaînes, représentée par autant de genres et d'espèces taxonomiques différents, isolés au niveau de sites hydrothermaux des océans Atlantique et Pacifique. Nos résultats semblent également indiquer que la majorité des espèces bactériennes recensées sont endémiques à chaque océan, à l'exception des isolats *A. macleodii*, *H. aquamarina*, *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus*, qui sont retrouvés dans les deux océans.

De plus, cette étude originale portant sur la biodiversité des bactéries marines associée aux environnements hydrothermaux profonds a permis de rapporter la présence de trois nouveaux genres bactériens capables de produire des PHA à courtes chaînes (*Alteromonas*, *Rheinheimera* et *Ruegeria*).



**Figure 37.** Position phylogénétique des souches bactériennes productrices de PHA à courtes chaînes, établie d'après les séquences nucléotidiques du gène codant l'ARNr 16S. (Les souches références sont en bleu et les numéros d'accension GenBank entre parenthèses. Les valeurs bootstrap >50% ne sont pas indiquées, l'échelle représente 0,02 substitution par 112 séquence. Les nombres dans les carrés comptabilisent les souches issues de l'océan Atlantique (bleu) ou Pacifique (rose).)

Ainsi, la **souche AT1212** ayant synthétisé du P(3HB) au laboratoire, est apparentée à l'espèce ***Rheinheimera aquimaris***, espèce pour laquelle la capacité de production de PHA était jusqu'ici inconnue (Yoon *et al.*, 2007; Ghasemi *et al.*, 2010). Cette découverte s'avère d'autant plus intéressante que des isolats de même espèce n'avaient été répertoriés qu'en région Pacifique, alors que l'isolat AT1212 est issu du mont hydrothermal Rainbow, situé au niveau de la ride médio-Atlantique.

De la même manière, la **souche ST329**, dont nous avons montré la capacité de production de PHA à courtes chaînes, est le premier représentant du genre ***Ruegeria*** signalé dans les eaux profondes du Pacifique. C'est aussi la seule  $\alpha$ -protéobactérie de cette étude. Il est par ailleurs intéressant de noter que les isolats du genre *Ruegeria* sont décrits pour leur résistance aux rayonnements ultra-violet de type B, et leurs propriétés anti-oxydantes vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et autres espèces réactives de l'oxygène (ROS), c'est-à-dire du stress oxydatif (Cunliffe, 2012; Matallana-Surget *et al.*, 2012). Ces études sont en accord nos observations, où la capacité de production et l'accumulation de PHA a non seulement un rôle de stockage énergétique chez les micro-organismes, mais est également associée aux stratégies de réponse aux stress environnementaux tels que les hautes (Wu *et al.*, 2011; Raiger lustman *et al.*, 2015) ou basses (Ayub *et al.*, 2009; Pavez *et al.*, 2009; Hauschild *et al.*, 2017) températures, ou les stress oxydatif (Kadouri *et al.*, 2005; Raiger-lustman and Ruiz, 2008; Goh *et al.*, 2014) et osmotique (Yin *et al.*, 2015; Obruca *et al.*, 2018).

Concernant à présent le troisième genre bactérien nouvellement identifié comme producteur de PHA, **cinq isolats** affiliés à l'espèce ***Alteromonas macleodii*** (ST277, ST279, ST321, HY755 et MA897) ont produit des PHAscl dans le cadre de cette étude, isolats échantillonnés auprès de sites hydrothermaux situés au niveau du bassin Fiji, de la dorsale Est-Pacifique et de la ride médio-Atlantique. Ces zones d'isolement coïncident avec les différentes observations effectuées par la communauté scientifique, indiquant l'existence de cette espèce dans les mers des deux hémisphères, de l'Antarctique à la Méditerranée, et ce tant en surface qu'en eaux profondes (García-Martínez *et al.*, 2002; López-López *et al.*, 2005). Par ailleurs, cette ubiquité sur le globe se justifie par le fait que ces micro-organismes sont **copiotrophes**, c'est-à-dire capables de croissance extrêmement rapide lorsque les ressources nutritives s'avèrent abondantes, et ce jusqu'à domination complète de la population microbienne environnante. En revanche, en cas de carence en matières

organiques, ces individus sont victimes de taux de mortalité particulièrement élevés (Ivars-Martinez *et al.*, 2008).

Les quatre autres genres bactériens producteurs de PHA à courtes chaînes identifiés dans le cadre de ces travaux (*Acinetobacter*, *Halomonas*, *Shewanella* et *Vibrio*) ont déjà été décrits dans la littérature pour leurs capacités de production de PHA. Ainsi, l'espèce ***Acinetobacter venetianus*** colonise préférentiellement l'océan Atlantique, et ce sur l'intégralité de la colonne d'eau (Meier *et al.*, 2016). Elle est décrite pour ses aptitudes de dégradation des hydrocarbures de types n-alcanes en subsurface (Baldi *et al.*, 1999), mais également pour ses capacités de synthèse de PHA (Wentzel *et al.*, 1986). De plus, l'étude récente de son génome révèle de fortes capacités de résistances aux métaux lourds (arsenic, cadmium, cobalt et zinc) (Fondi *et al.*, 2013). Ces travaux de thèse ont mis en évidence deux représentants de l'espèce *A. venetianus* (**souches MS955 et AT1218**), échantillonnés aux abords de fumeurs noirs toxiques des sites hydrothermaux profonds Rainbow et Snake Pit. Nos observations confirment la tolérance de l'espèce *A. venetianus* vis-à-vis des métaux lourds, et ses capacités à synthétiser des PHA à courtes chaînes.

Concernant les espèces halotolérantes assimilées au genre ***Halomonas***, celles-ci sont qualifiées d'ubiquistes car présentes dans toutes les eaux du globe. Ces micro-organismes ont été particulièrement étudiés, y compris pour leurs performances en matière de synthèse de PHA (Quillaguamán *et al.*, 2010). Dans le cadre de cette thèse, les analyses phylogénétiques ont regroupées **19 souches** productrices de PHA à courtes chaînes, appartenant au genre *Halomonas* et affiliées à quatre espèces. Ainsi ont été recensées deux souches apparentées à l'espèce ***H. profundus***, d'ores et déjà décrite au laboratoire et issue des mêmes conditions écologiques (C. Simon-Colin *et al.*, 2008), et cinq micro-organismes également échantillonnés à proximité du mont hydrothermal Rainbow, affiliés à l'espèce ***H. titanicae***, historiquement découverte en milieu marin profond Atlantique et réputée pour ses capacités d'oxydation des éléments ferreux (Sánchez-Porro *et al.*, 2010). De plus, cinq autres isolats récoltés près de cheminées hydrothermales du Sud Pacifique et assimilés à l'espèce ***H. meridiana***, qualifiée d'halotolérante extrême par James *et al.* (1990) ont produit des PHA, ainsi que sept souches proches de l'espèce ***H. aquamarina***, dont deux issues des sites hydrothermaux Rainbow et Snake Pit, et cinq autres originaires du Nord du bassin Fiji (Pacifique), à l'image des découvertes de Kaye and Baross (2000). Ces micro-organismes

appartenant au genre *Halomonas* semblent particulièrement aptes à coloniser tous types de milieux marins extrêmes, puisque ceux-ci ont également été retrouvés au sein de bassins anoxiques hypersalés marins profonds en mer Méditerranée (Sass *et al.*, 2001), où la concentration ions NaCl peut atteindre 200 g/L, soit un taux sept fois supérieur à celui de l'eau de mer classique.

En parallèle, cette étude a permis de recenser un isolat assimilé à l'espèce ***Shewanella algae* (souche HE798)**, natif d'un des nombreux sites hydrothermaux de la dorsale Est-Pacifique et pour lequel la production de PHA à courtes chaînes a été mise en évidence. Une précédente étude avait déjà fait part de ces capacités de synthèse de PHA, à partir d'autres espèces de *Shewanella*, également issues d'eaux profondes en région Pacifique (Numata *et al.*, 2013). Néanmoins, peu de travaux ont été publiés à ce sujet, probablement du fait du faible taux d'accumulation intracellulaire de PHA au sein de ces micro-organismes.

Enfin, **la majorité des souches capables de synthétiser des PHAscl identifiées lors de ces travaux appartiennent au genre *Vibrio***. Comme les individus du genre *Halomonas*, les *Vibrio* sont présents dans toutes les mers et océans du globe, et ce sur l'intégralité de la colonne d'eau. De surcroît, certaines espèces ont déjà été remarquées pour leurs capacités à synthétiser des polymères de types PHA et/ou exopolysaccharides (Chien *et al.*, 2007; Sathiyarayanan *et al.*, 2017; Drouillard *et al.*, 2018). Ainsi, cette étude a permis d'identifier de nouveaux représentants affiliés à l'espèce ***V. paraheamolyticus***, échantillonnés aux abords des cheminées hydrothermales Rainbow et Snake Pit, et de montrer leur capacité de production de PHA à courtes chaînes, à l'instar des espèces ***V. diabolicus*** et ***V. neocaledonicus***, précédemment décrites au LM2E, (Raguénès *et al.*, 1997; Chalkiadakis *et al.*, 2013). Malgré la présence de nombreux individus du genre *Vibrio* dans les communautés bactériennes marines, la littérature s'intéresse principalement aux *Vibrio* comme pathogènes humains, vecteurs de maladies gastro-intestinales (Makino *et al.*, 2003), ou à leur rôle stimulateur du système immunitaire chez certains bivalves hydrothermaux (Bettencourt *et al.*, 2009). Quelques études s'intéressant à la virulence de la souche ***V. alginolyticus*** semblent cependant indiquer que les *Vibrio* joueraient un rôle écologique majeur au sein de la faune hydrothermale, en participant activement à la régulation des

populations animales en matière d'effectifs et de résistances physiologiques, tant dans l'océan Atlantique que Pacifique (Hasan *et al.*, 2015).

**En conclusion, la caractérisation taxonomique et les études phylogénétiques basées l'analyse des séquences de l'ARNr 16S des isolats producteurs de PHA à courtes chaînes a permis d'explorer une part de la biodiversité bactérienne échantillonnée aux abords de sites hydrothermaux des océans Atlantique et Pacifique.**

### **II. 3. 3. 3. Analyse phylogénétique des souches bactériennes basée sur la détection du gène *phaC***

L'arbre phylogénétique regroupant les affiliations taxonomiques de **131 souches** bactériennes identifiées comme porteuses du gène *phaC* grâce à la méthode de criblage moléculaire mise en place dans le cadre de ces travaux est présenté en **Figure 38**. Cette analyse met en évidence une large diversité bactérienne associée aux grands fonds marins, représentée par **14 genres bactériens** différents (*Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Marinomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Ruegeria*, *Shewanella*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* et *Vibrio*), répartis en deux classes (Firmicutes et Protéobactéries), la classe des Protéobactéries étant scindée en deux phylum (alpha et gamma). Les séquences relatives à l'ARNr 16S ont été déposées dans la base de données NCBI GenBank, les numéros d'accès correspondants sont regroupés dans le **Tableau 10**.

A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la diversité bactérienne globale des monts hydrothermaux des océans Atlantique et Pacifique. De plus, ces études utilisent dans la plupart des cas une approche métagénomique globale (Sogin *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2007), et très peu de données phylogénétiques concernent des micro-organismes bactériens cultivés isolés de sites hydrothermaux (Xu *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2013).

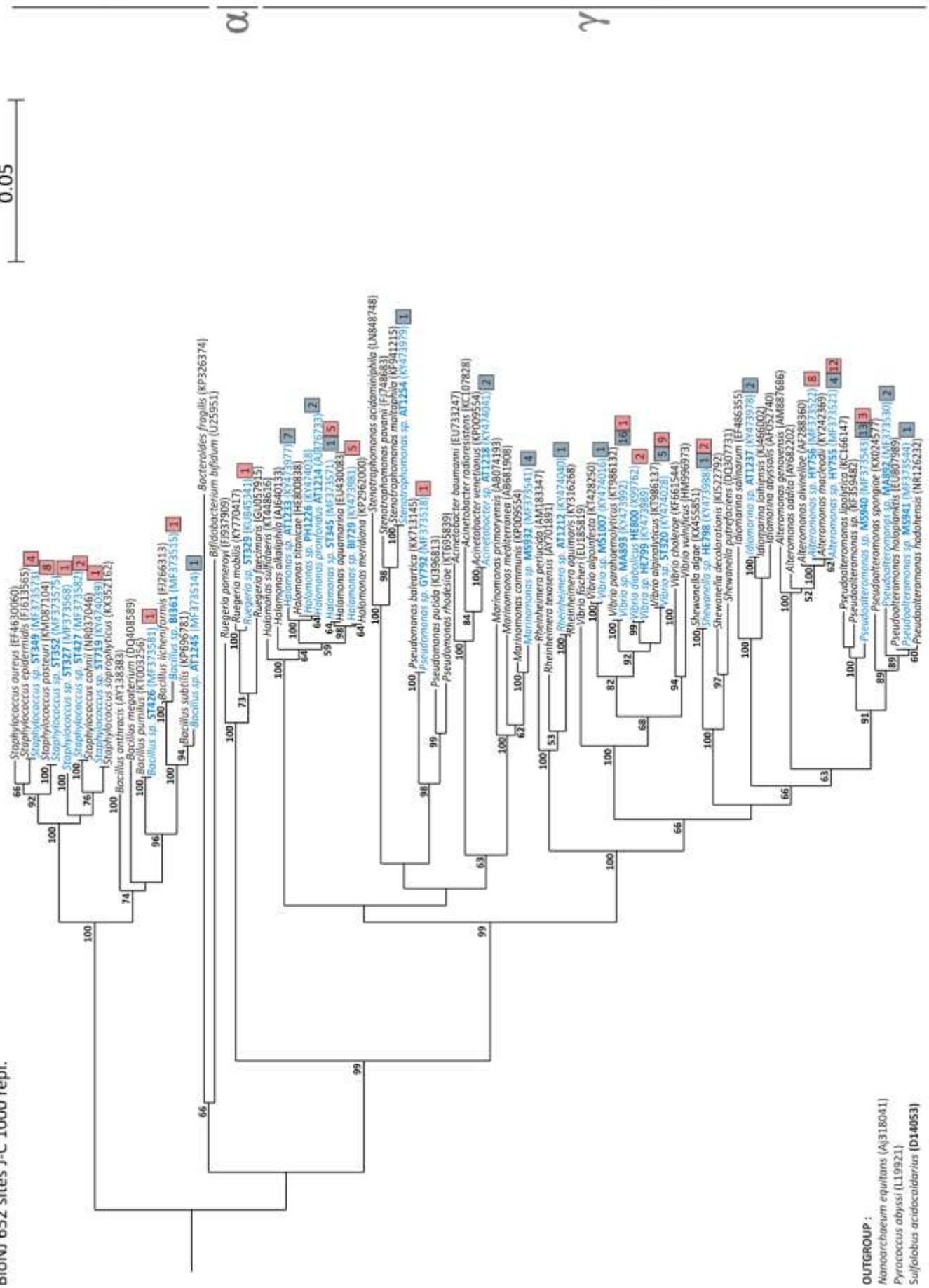
**En conclusion, l'étude phylogénétique basée sur la séquençage de l'ARNr 16S extrait des isolats bactériens a permis d'appréhender une part de la biodiversité des**

**souches de la collection Ifremer-LM2E, et met en exergue certains genres pour leur capacité élevée d'accumulation de PHA, comme *Halomonas*, et d'autres pour lesquels la synthèse de PHA était jusqu'ici inconnue (*Altermonas*, *Rheinheimera*, *Ruegeria*).**

Par ailleurs, les données taxonomiques en lien avec la distribution géographique des isolats enrichissent nos connaissances sur l'écologie des communautés microbiennes colonisant les écosystèmes marins profonds. En particulier, la capacité de nombreuses souches à accumuler des PHA, dont le rôle a été démontré dans les mécanismes de survie et de résistance aux stress environnementaux, constitue sans nul doute un atout majeur pour ces micro-organismes, exposés à des conditions environnementales extrêmes.

0.05

BioNJ 652 sites J-C 1000 repl.



**OUTGROUP:**

- Nanoarchaeum equitans (AJ318041)
- Pyrococcus abyssi (L19923)
- Sulfolobus acidocaldarius (D14053)

**Figure 38.** Position phylogénétique des souches bactériennes détectées positives pour le gène *phaC*, établie d’après les séquences nucléotidiques du gène codant l’ARNr 16S. Les souches références sont en bleu et les numéros d’accession GenBank entre parenthèses. Les valeurs bootstrap >50% ne sont pas indiquées, l’échelle représente 0,05 substitution par 118 séquence. Les nombres dans les carrés comptabilisent les souches issues de l’océan Atlantique (bleu) ou Pacifique (rose).

**Tableau 10.** Numéros d'accèsion NCBI GenBank correspondant à l'ARNr 16S des souches porteuses du gène *phaC*.

*nc* : numéro d'accèsion non déterminé

<b>Souche</b>	<b>N° Accession</b>	<b>Souche</b>	<b>N° Accession</b>	<b>Souche</b>	<b>N° Accession</b>
<b>ST269</b>	KY474020	<b>ST414</b>	MF373579	<b>MS950</b>	KY473994
<b>ST270</b>	<i>nd</i>	<b>ST417</b>	MF373580	<b>MS951</b>	MF373546
<b>ST272</b>	<i>nd</i>	<b>ST426</b>	MF373581	<b>MS955</b>	KY473997
<b>ST276</b>	KY474021	<b>ST427</b>	MF373582	<b>MS967</b>	MF373548
<b>ST277</b>	MF373555	<b>ST719</b>	KY474039	<b>MS970</b>	MF373549
<b>ST279</b>	MF373556	<b>BI725</b>	KY473980	<b>MS973</b>	KY473998
<b>ST280</b>	MF373557	<b>BI729</b>	KY473981	<b>MS977</b>	KY473999
<b>ST282</b>	MF373558	<b>BI742</b>	KY473982	<b>MS978</b>	KY474000
<b>ST283</b>	KY474022	<b>HY750</b>	<i>nd</i>	<b>MS979</b>	MF373550
<b>ST286</b>	KY474023	<b>HY753</b>	MF373519	<b>MS980</b>	KY474001
<b>ST298</b>	KY474024	<b>HY754</b>	MF373520	<b>MS981</b>	KY474002
<b>ST299</b>	KY474025	<b>HY755</b>	MF373521	<b>MS982</b>	KY474003
<b>ST302</b>	MF373560	<b>HY756</b>	MF373522	<b>MS983</b>	MF373551
<b>ST303</b>	MF373561	<b>HY757</b>	MF373523	<b>MS984</b>	KY474004
<b>ST305</b>	MF373562	<b>HY760</b>	MF373524	<b>MS986</b>	KY474005
<b>ST308</b>	KY474027	<b>HY761</b>	MF373525	<b>MS988</b>	MF373552
<b>ST309</b>	<i>nd</i>	<b>HY762</b>	MF373526	<b>MS989</b>	KY474006
<b>ST310</b>	MF373563	<b>HY763</b>	MF373527	<b>MS990</b>	KY474007
<b>ST311</b>	MF373564	<b>GY792</b>	MF373518	<b>MS991</b>	KY474008
<b>ST314</b>	<i>nd</i>	<b>GY795</b>	<i>nd</i>	<b>MS992</b>	KY474009
<b>ST315</b>	MF373565	<b>HE798</b>	KY473988	<b>MS994</b>	MF373553
<b>ST320</b>	KY474028	<b>HE799</b>	KY473989	<b>MS996</b>	KY474010
<b>ST321</b>	MF373566	<b>HE800</b>	X99762	<b>MS999</b>	KY474012
<b>ST324</b>	MF373567	<b>HE801</b>	KY473990	<b>MS1001</b>	KY474013
<b>ST327</b>	MF373568	<b>MA881</b>	MF373528	<b>MS1002</b>	KY474014
<b>ST329</b>	KY474029	<b>MA891</b>	KY473991	<b>MS1005</b>	KY474015
<b>ST330</b>	KY474030	<b>MA892</b>	MF373530	<b>MS1006</b>	MF373554
<b>ST331</b>	KY474031	<b>MA893</b>	KY473992	<b>MS1007</b>	KY474016
<b>ST334</b>	KY474032	<b>MA897</b>	KY473993	<b>AT1211</b>	MF373511
<b>ST337</b>	MF373570	<b>MS911</b>	MF373531	<b>AT1212</b>	KY474040
<b>ST340</b>	KY474033	<b>MS914</b>	MF373532	<b>AT1213</b>	KY435947
<b>ST345</b>	MF373571	<b>MS916</b>	<i>nd</i>	<b>AT1214</b>	AJ876733
<b>ST346</b>	MF373572	<b>MS917</b>	MF373534	<b>AT1216</b>	KY473973
<b>ST347</b>	KY474034	<b>MS919</b>	MF373535	<b>AT1218</b>	KY474041
<b>ST348</b>	KY474035	<b>MS925</b>	MF373537	<b>AT1221</b>	KY473974
<b>ST349</b>	MF373573	<b>MS926</b>	MF373538	<b>PH1226</b>	KY474018
<b>ST350</b>	KY474036	<b>MS927</b>	MF373539	<b>AT1229</b>	KY473975
<b>ST351</b>	MF373574	<b>MS931</b>	MF373540	<b>AT1230</b>	KY473976
<b>ST352</b>	MF373575	<b>MS932</b>	MF373541	<b>AT1233</b>	KY473977
<b>ST353</b>	MF373576	<b>MS935</b>	MF373542	<b>AT1237</b>	KY473978
<b>BI361</b>	MF373515	<b>MS937</b>	KY473996	<b>AT1239</b>	<i>nd</i>
<b>BI362</b>	MF373516	<b>MS940</b>	MF373543	<b>AT1245</b>	MF373514
<b>ST395</b>	MF373577	<b>MS941</b>	MF373544	<b>AT1254</b>	KY473979
<b>ST412</b>	MF373578	<b>MS942</b>	MF373545		

# **CHAPITRE III**

**SYSTEMES PARTICULAIRES POREUX HYBRIDES**

**ORGANIQUES-INORGANIQUES BIOCOMPATIBLES**



### III. 1. Introduction

La seconde partie de cette thèse s'est intéressée à la modification chimique de PHA par greffage de groupements sulfonates et de PEG, pour induire la synthèse de matériaux hydrosolubles adaptés pour le revêtement de nanoparticules de type MOF, à visée thérapeutique. Des tests préliminaires ont été effectués sur des copolymères de P(3HB4HB) produits par fermentation bactérienne, afin d'obtenir des matériaux amphiphiles fonctionnalisables, mais les premiers résultats obtenus en matière de rendement et de solubilité n'ont pas été concluants, et restent à optimiser.

Nous avons donc poursuivi ces travaux à partir d'un PHA à moyennes chaînes de type poly(3-hydroxyoctanoate-3-hydroxyundecenoate) ou PHOU, car les techniques de fonctionnalisation chimique sont maîtrisées au laboratoire. Des groupements sulfonates permettant les interactions entre le PHOU et la surface du MOF, et du PEG, apportant un caractère furtif à la structure, ont été utilisés pour la synthèse de PHA fonctionnalisés solubles. Ces greffages ont été réalisés par réaction thiol-ène sur les groupements latéraux insaturés du PHOU et les groupements thiols du 3-mercaptopropyl-1-éthanesulfonate de sodium ( $\text{SH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ ) et du PEG méthyle éther thiol ( $\text{SH}(\text{CH}_2)_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{45}\text{OCH}_3$ ).

Ensuite, des systèmes hybrides poreux MOF (Metal-Organic Framework)-PHA ont été développés, pour promouvoir l'encapsulation et la délivrance de principes actifs. La biocompatibilité de ces nanoparticules hybrides vis-à-vis de cellules immunitaires de type macrophage a ensuite été évaluée, à l'aide de tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire.

## III. 2. Matériels & Méthodes

### III. 2. 1. Matériels

Le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ), le diméthylsulfoxyde (DMSO), le méthanol (MeOH) et le tétrahydrofurane (THF) ont été fournis par VWR International (Radnor, USA). Les réactifs 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone (DMPA), sodium-3-mercaptopropionate ( $\text{SO}_3^-$ ), poly(éthylène glycol) méthyle éther thiol (PEG,  $M_n = 2000 \text{ g/mol}$ ) et rhodamine b ont été commandés chez Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA). Les membranes de dialyse 1 et 6-8 kDa molecular weight cut-off (MWCO) ont été obtenues chez Spectrumlabs (Rancho Dominguez, USA).

### III. 2. 2. Synthèse de PHA amphiphiles

#### III. 2. 2. 1. Synthèse de $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-_{(20)}$

Une première phase de fonctionnalisation a été effectuée pour générer la synthèse de PHA amphiphile, par greffage de groupements sulfonates sur les insaturations terminales des chaînes latérales du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$ . Pour ce faire, 100 mg de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$   $M_n = 40000 \text{ g/mol}$  (soit  $2,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$  d'insaturations C=C) et 0,2 eq/C=C de DMPA ou 11 mg ont été dissous dans 6 mL de THF dans un ballon de 50 mL, pour constituer la solution 1 (SOL 1). En parallèle, 1,2 eq/C=C soit 42 mg de 3-mercaptopropionate de sodium ont été solubilisés dans 6 mL de MeOH, avant ajout goutte à goutte de 3 mL de THF (SOL 2). Cette nouvelle solution a été irradiée aux rayons ultraviolets pendant 10 min à température ambiante à l'aide d'un Lightning cure LC8, équipé d'une lampe mercure-xénon de  $180 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  disposée 11 cm au-dessus de l'échantillon.

Cette solution a été mélangée à 30 mL de DMSO avant purification par dialyse contre 2 L d'eau renouvelés trois fois par jour pendant 72 h, au moyen d'une membrane perméable de 1000 Da MWCO. En fin de période de dialyse, la solution a été lyophilisée, avant stockage

au réfrigérateur dans un pilulier contenant 6 mL de DMSO, soit une concentration de 16,7 g/L.

### III. 2. 2. Synthèse de $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ et de $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$

Une seconde phase de fonctionnalisation par réaction photochimique a été réalisée pour engendrer le greffage de groupements PEG. Ainsi, 50 mg de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-(20)$  ou 3 mL de solution stock ont été prélevés et redistribués dans un ballon de 10 mL en présence de 3 ou 8 eq/C=C de PEG méthyle éther thiol ( $M_n = 2000$  g/mol), soit respectivement 210 ou 559 mg, et 0,2 eq/C=C de photoinitiateur DMPA ou 18 mg. La solution a ensuite été irradiée pendant 30 min à température ambiante à l'aide d'un Lightning cure LC8, équipé d'une lampe mercure-xénon de  $180 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$  disposée 11 cm au-dessus de l'échantillon.

Cette solution a été diluée à 2 g/L dans du DMSO avant purification par dialyse contre 2 L d'eau renouvelés trois fois par jour pendant 72 h, au moyen d'une membrane perméable de 6-8 kDa MWCO. L'opération a été répétée quatre fois pour assurer l'élimination optimale des résidus PEG libres, non greffés. En fin de période de dialyse, la solution a été lyophilisée, puis le polymère résiduel a été stocké dans du DMSO à une concentration de 16,7 g/L, au réfrigérateur à l'abri de la lumière.

D'autre part, dans l'optique d'observations des nanoparticules hybrides en microscopie confocale, 10 eq/C=C de marqueur fluorescent de type rhodamine b soit 20 mg ont été dissous au contact de 20 mg de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  dans 2,39 mL de DMSO (soit une concentration de 16,7 g/L). Cette solution a ensuite été purifiée par quatre cycles de dialyse.

### III. 2. 3. Conception de nanoparticules hybrides MOF-PHA

Afin de développer un système d'encapsulation innovant, des nanoparticules de type MOF ont été enrobées des PHA greffés, pour l'élaboration de nanoparticules hybrides MOF-PHA.

Les nanoparticules de type MOF fer-carboxylate MIL-100(Fe) utilisées dans le cadre de ces travaux ont été fournies par l'équipe du Dr. Ruxandra GREF à l'Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (Agostoni, Horcajada, *et al.*, 2013). Ainsi, 6 mM de chlorure de fer(III) hexahydraté et 4,02 mM d'acide 1,3,5,-benzenetricarboxylique ont été homogénéisés dans 20 mL d'eau ultra pure puis chauffés par un système à micro-ondes à 130°C, 400 W (Mars-5, CEM Corporation, Matthews, USA), sous agitation magnétique pendant 6 min.

Les composés non désirés ont été éliminés par centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min. Cette étape de purification a été répétée six fois avant stockage des MOF dans l'EtOH absolu (25 g/L ou 19 g/L selon les lots), à température ambiante. Un diamètre de 270 nm a été calculé par DLS pour ce lot de nanoparticules MOF MIL-100(Fe), ainsi qu'une valeur  $S_{\text{BET}} = 1923 \pm 200 \text{ m}^2/\text{g}$  déterminée par  $\text{N}_2$  sorption, et des pores de haut volume ( $V_p = 0,99 \text{ cm}^3/\text{g}$ ).

Enfin, les nanoparticules hybrides MOF-PHA ont été synthétisées à partir de 1 mg ou 40  $\mu\text{L}$  de MOF MIL-100(Fe), homogénéisés au contact de 17 à 83% (w/w, selon les expériences) soit 0,4 ; 1 ; 2 ; 4 ou 10 g/L de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , dans un volume final d'eau ultra pure de 500  $\mu\text{L}$  (concentration finale de MOF = 2 g/L), sous agitation douce pendant 1 h, à température ambiante et dans l'obscurité.

### III. 2. 4. Caractérisations physico-chimique et microscopique des polymères synthétisés

Les PHA produits lors de cette étude ont été caractérisés par résonance magnétique nucléaire ou RMN  $^1\text{H}$ . Tenant compte de la solubilité des polymères, 10 mg de composés ont été dissous dans 600  $\mu\text{L}$  soit de  $\text{CDCl}_3$ , de DMSO- $d_6$ , de  $\text{D}_2\text{O}$  ou de THF- $d_8$  (Eurisotop). Les solutions ont été ensuite analysées à l'aide d'un spectromètre Bruker AV400 MHz.

La masse molaire des polymères synthétisés durant ces travaux a été déterminée par chromatographie d'exclusion stérique ou SEC après dissolution des polymères à 10 g/L dans du  $\text{CHCl}_3$  ou du  $\text{LiNO}_3^-$  (0,5 M) aqueux, en fonction des capacités de solubilisation considérées. Ainsi, les solutions à base de chloroforme ont été injectées dans deux colonnes Shodex GPC K-805L (5  $\mu\text{m}$  Mixte-C) à l'aide d'une pompe Shimadzu LC-10AD, tandis que les solutions aqueuses ont été injectées dans deux colonnes PL aquagel-OH 40-30 (8  $\mu\text{m}$  Mixte-C). Des standards de polystyrène ( $3 \cdot 10^4$  -  $2 \cdot 10^6$  g/mol) ou de PEO (poly-éthylène oxyde, 106 -  $4,4 \cdot 10^4$  g/mol) ont été utilisés pour calibrer le système. Le détecteur utilisé est un réfractomètre Wyatt Technology Optilab Rex (Santa Barbara, USA).

L'analyse thermique des polymères synthétisés a été menée par calorimétrie différentielle à balayage ou DSC (Perkin Elmer Diamond DSC, Waltham, USA). Ainsi, 10 mg de matériaux ont été analysés suivant un protocole comptant une première phase de chauffage de  $-60$  à  $200^\circ\text{C}$  à  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , une phase de refroidissement jusque  $-60^\circ\text{C}$  à  $200^\circ\text{C}/\text{min}$ , avant une seconde phase de chauffage jusqu'à  $200^\circ\text{C}$  à  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , sous azote.

Les tailles des nanoparticules hybrides MOF-PHA et leurs charges ont été déterminées à l'aide d'un appareil Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Pour cela, 100  $\mu\text{L}$  de solution de nanoparticules constitués de 2 g/L de MOF annexés à 0,4 ; 1 ; 2 ; 4 ou 10 g/L de copolymères de PHA ont été dilués dans 900  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure stérile ou de tampon phosphate salin (PBS 1X), et versés dans des cuves PMMA 2,5 mL (DLS) ou DTS1070 Malvern (potentiel zêta). Pour chaque échantillon analysé, trois mesures successives ont été effectuées incluant 15 mesures de 20 s, et converties en données moyennes (Z-average).

Les nanoparticules hybrides MOF-PHA ont été observées par un microscope électronique à balayage ou TEM Merlin Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) avec une tension comprise entre 2 et 5 kV, couplé à un détecteur EDX Advanced SDD X-Max (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, UK) opérant à 5 kV. La morphologie des nanoparticules hybrides MOF-PHA a également été observée à l'aide d'un microscope JEOL-2100F (JEOL Ltd, Akishima, Japan). La composition chimique a été déterminée par TEM à balayage (STEM, ou scanning-TEM) de type FEI TECNAI G2 F20 opérant à 200 kV, équipé de spectromètres à rayons X à énergie dispersive (EDX) et à perte d'énergie électronique (EELS).

### **III. 2. 5. Tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire sur une lignée cellulaire de type macrophages au contact de nanoparticules MOF-PHA**

#### **III. 2. 5. 1. Culture des cellules modèles J774.A1**

Les cellules murines adhérentes de type macrophage ont été cultivées dans un milieu Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) GlutaMAX<sup>TM</sup> supplémenté de sérum bovin foetal inactivé (10%), de pénicilline G (100 U/mL) et de streptomycine (0,1 mg/mL) (ThermoFisher Scientific), maintenu à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu a été renouvelé en fin de phase exponentielle de croissance des cellules, environ trois fois par semaine.

#### **III. 2. 5. 2. Tests de cytotoxicité**

L'éventuelle toxicité des nanoparticules hybrides MOF-PHA à l'égard des macrophages J774.A1 a été évaluée à l'aide de deux tests commerciaux, le kit CytoTox Fluor<sup>TM</sup> (Promega) et le kit LDH cytotoxicity (Roche).

Le kit CytoTox Fluor permet de mesurer la fluorescence émise par le réactif bis-AAH-R110, dépendant de l'activité protéase émise en cas de lyse cellulaire. Ainsi, 10000 cellules J774.A1 ont été déposées dans chaque puits d'une plaque de culture de 96 puits, en présence de 16,7 ; 33,3 ; 66,7 ou 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , pour un volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Les expériences ont été réalisées en quadruplicat, le blanc était composé de 100  $\mu\text{L}$  de DMEM, le témoin négatif de 10000 cellules J774.A1 non traitées, et le témoin positif de 50  $\mu\text{L}$  de milieu DMEM contenant 10000 cellules J774.A1 et 50  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure stérile.

Après 24 h d'incubation à 37°C et 5% de  $\text{CO}_2$ , 100  $\mu\text{L}$  de solution révélatrice fournie par le fabricant ont été ajoutés dans chaque puits. Au bout de 60 min d'incubation supplémentaires, la fluorescence des composés bis-AAH-R110 a été mesurée à l'aide d'un Glomax microplate reader (Promega), selon des paramètres d'excitation fixés à 475 nm, et d'émission compris entre 500 et 550 nm.

D'autre part, le kit LDH cytotoxicity permet de mesurer l'absorbance liée aux enzymes lactate deshydrogénases issues de cellules endommagées, lysées, par réaction colorimétrique. Dès lors, 20000 cellules J774.A1 ont été déposées dans chaque puits d'une plaque de culture de 96 puits, en présence de 25 ; 50 ; 100 ; 200 ou 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , pour un volume final de 100  $\mu\text{L}$ . Les expériences ont été réalisées en quadruplicat, le blanc était composé de 100  $\mu\text{L}$  de DMEM, le témoin négatif de 20000 cellules J774.A1 non traitées, et le témoin positif de 50  $\mu\text{L}$  de milieu DMEM contenant 20000 cellules J774.A1 et 50  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure stérile.

Après 24 h d'incubation à 37°C et 5% de  $\text{CO}_2$ , 100  $\mu\text{L}$  de réactif fourni par le fabricant ont été ajoutés dans chaque puits. Au bout de 15 min d'incubation supplémentaires, 50  $\mu\text{L}$  de tampon initiant l'arrêt de toute réaction enzymatique ont été distribués dans chaque puits. Enfin, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un Clariostar microplate reader (BMG LABTECH, Offenburg, Germany), selon des paramètres d'excitation fixés à 490 nm, et d'émission arrêtés à 680 nm.

### III. 2. 5. 3. Test de prolifération cellulaire

Le développement des macrophages J774.A1 en présence de différentes concentrations de copolymères de PHA libres ou de nanoparticules de type MOF nus ou hybrides MOF-PHA, a été évalué à l'aide du test commercial RealTime Glo™ MT Cell Viability (Promega). La viabilité cellulaire directement associée à la prolifération des cellules est mesurée à partir de substrats marqueurs par bioluminescence, réduits par l'activité enzymatique des cellules vivantes.

Ainsi, 5000 cellules J774.A1 ont été déposées dans chaque puits d'une plaque de culture de 96 puits, en présence de 25 ; 50 ; ou 100 µg/mL de nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , de 0,2 µL de substrat MT cell et de 0,2 µL de réactif NanoLuciferase, pour un volume final de 100 µL. Les expériences ont été réalisées en quadruplicat, le blanc était composé de 100 µL de DMEM, le témoin positif de 5000 cellules J774.A1 non traitées, et le témoin négatif de 50 µL de milieu DMEM contenant 5000 cellules J774.A1 et de 50 µL d'eau ultra pure stérile.

Les plaques ont été incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 72 h, la bioluminescence a été mesurée tous les jours à l'aide d'un Glomax microplate reader.

### III. 2. 6. Observations par microscopie confocale à balayage laser

La morphologie et les capacités d'internalisation des macrophages murins J774.A1 au contact de copolymères de PHA libres ou de nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de copolymères de PHA ont été observées par microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Ainsi, 200000 cellules J774.A1 ont étéensemencées une journée dans 1 mL de milieu de culture DMEM dans une plaque de 6 puits, en présence d'une lame de verre stérile.

Le lendemain et après vérification de l'adhérence des cellules au support, 50 µL de DMEM ont été ajoutés dans le puits 1 (témoin positif), 100 µg/mL de nanoparticules de type

MOF dans le puits 2, 100 µg/mL de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  imprégnés de rhodamine b dans les puits 3 et 4, et une solution constituée de 100 µg/mL de MOF enrobés de copolymères fluorescents dans les puits 5 et 6.

Après 3 h d'incubation à 34°C sous 5% de  $\text{CO}_2$ , les milieux de culture ont été délicatement retirés à la pipette et remplacés par 1 mL de mélange fixateur composé de paraformaldéhyde (4%)/PBS (1M). Au bout de 10 min d'incubation sous hotte à température ambiante, les milieux ont été jetés avant rinçage des puits pendant 2 min avec 1 mL de solution tampon PBS. L'opération a été répétée trois fois pour assurer l'élimination complète du fixateur.

Ensuite, 300 ng/mL de 4'-6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) fluorescent, capable de se fixer de manière irréversible aux acides nucléiques adénine et thymine de l'ADN (présent dans le noyau des cellules), ont été ajoutés dans chaque puits à l'abri de la lumière. Après 5 min d'incubation, les puits ont à nouveau été rincés trois fois avec 1 mL de tampon PBS pendant 2 min. Enfin, les lamelles fixées ont été déposées à l'envers sur une lame contenant une goutte de milieu de montage Vectashield (Burlingame, USA).

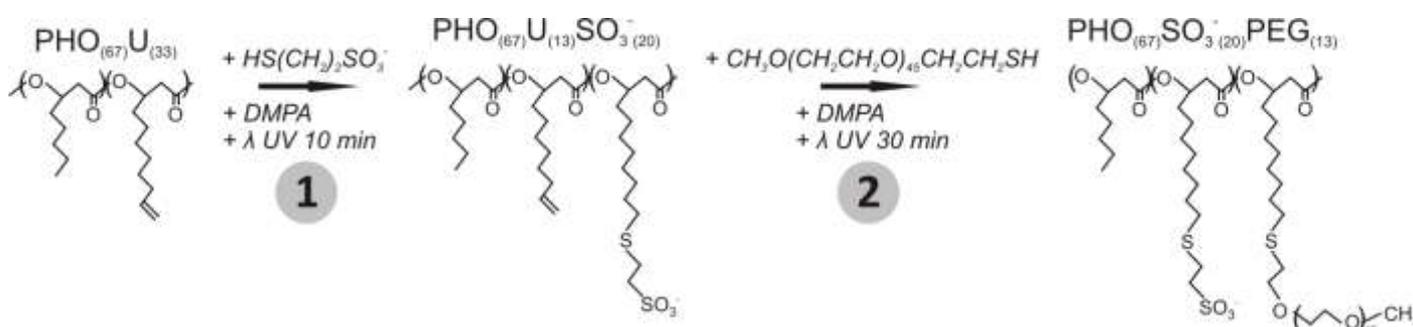
Les images ont été obtenues à partir d'un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP5-AOBS (Leica, Wetzlar, Germany), équipé d'un objectif à immersion Leica x63 HCX Plan APO CS, NA 1,4, pinhole 1 AU. Un laser UV opérant à 364 nm et un laser hélium-néon visible réglé à 543 nm ont été utilisés pour exciter les cellules. Les émissions fluorescentes ont quant à elles été collectées entre 406 nm et 513 nm à partir du fluorophore DAPI, et entre 551 nm et 654 nm pour les signaux relatifs à la rhodamine b. D'autre part, la taille de l'image xy a été fixée à 512 x 512 pixels (zoom 1 : 246,03 x 246,03 µm<sup>2</sup>, zoom 3 : 82,02 x 82,01 µm<sup>2</sup> et zoom 5 : 49,21 x 49,21 µm<sup>2</sup>), pour une moyenne de quatre acquisitions par image.

### III. 3. Résultats & Discussion

#### III. 3. 1. Synthèse de PHA à moyennes chaînes hydrosolubles

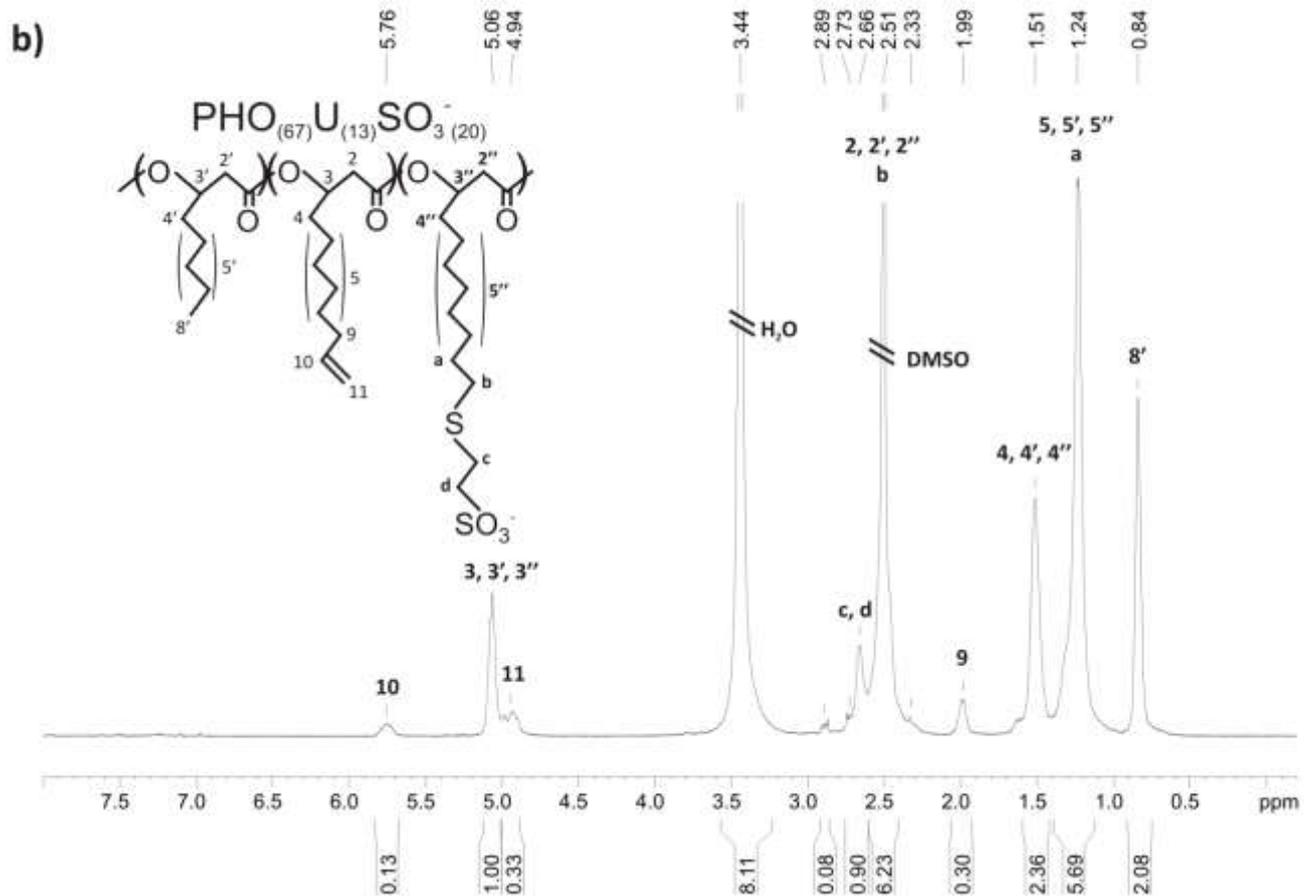
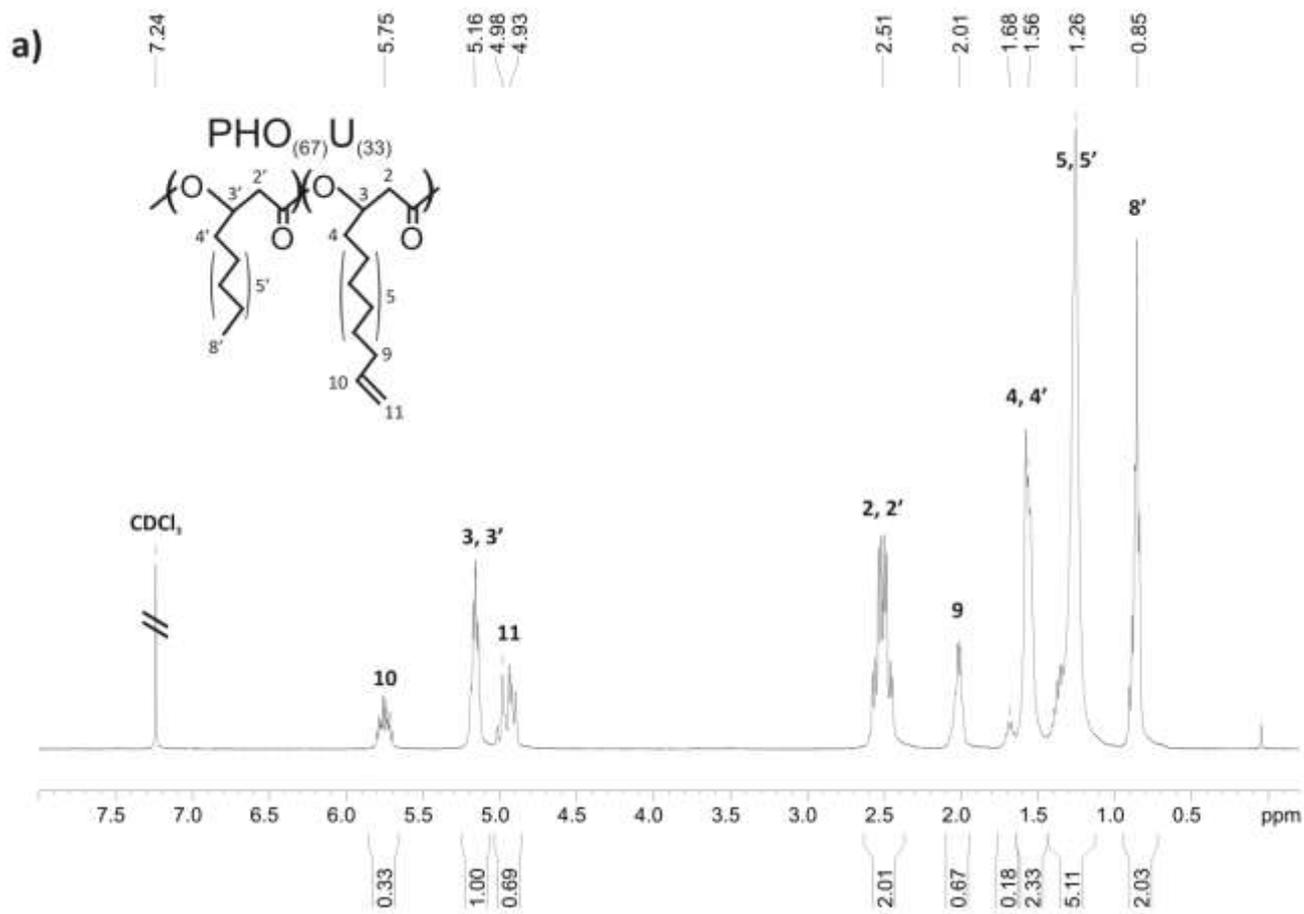
##### III. 3. 1. 1. Greffage de groupements sulfonates

Afin d'obtenir un PHA de haute masse molaire mais néanmoins soluble en solution aqueuse, deux types de groupements polaires ont été greffés par réaction thiol-ène sous irradiation photochimique, sur les insaturations terminales des chaînes latérales du PHOU. Dans un premier temps, des groupements sulfonates  $\text{SO}_3^-$  ont été greffés sur les doubles liaisons terminales libres du PHOU, non seulement pour apporter une certaine propriété d'amphiphilie au matériau (Modjinou *et al.*, 2015), mais également pour induire la fixation non covalente des ions  $\text{SO}_3^-$  aux ions  $\text{Fe}^{3+}$ , présents à la surface des nanoparticules de type MOF, par simple imprégnation (Agostoni *et al.*, 2015; Aykaç *et al.*, 2017), comme indiqué sur la **Figure 39**.



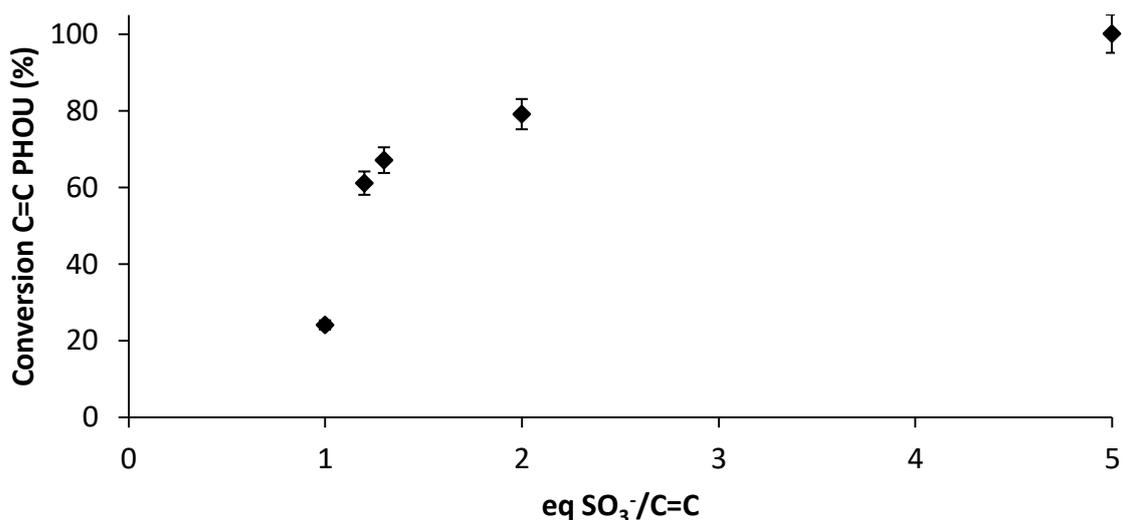
**Figure 39.** Modifications chimiques du PHOU impliquant le greffage (1) de groupements sulfonates ( $\text{SO}_3^-$ ) puis (2) de poly(éthylène glycol) par réaction thiol-ène photoactivée.

Le PHA à moyennes chaînes de type poly-(3-hydroxyoctanoate-3-hydroxyundecenoate) ou PHOU a été caractérisé par RMN  $^1\text{H}$  (**Figure 40a**) afin de déterminer le pourcentage d'insaturations terminales présentes sur les chaînes latérales, par intégration des protons correspondants au pic du CH (3 et 3') de la structure du PHOU à 5,16 ppm, et au signal relatif au groupement vinyle terminal de la chaîne latérale du motif HU (10) à 5,75 ppm. Le PHOU utilisé présente **33%** de double liaison et sera noté PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(33)</sub>.



**Figure 40.** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(33)</sub> (a) dans le CDCl<sub>3</sub> et du PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(13)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub> (b) dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

Le 3-mercaptopropyl-1-éthanesulfonate de sodium a été greffé sous activation photochimique, en utilisant 1 à 5 équivalents molaires de sulfonates ( $\text{SO}_3^-$ ). Après purification par dialyse, les polymères ont été analysés par RMN  $^1\text{H}$ , et les signaux relatifs aux deux méthylènes  $\text{CH}_2$  (c, d), caractéristiques des groupements sulfonates, apparaissent à 2,66 ppm, témoignant du succès du greffage. Les pourcentages de conversion des doubles liaisons terminales en  $\text{SO}_3^-$  ont été calculés en comparant les intégrations des protons correspondants au pic du CH (3, 3' et 3'') de la structure du PHOU à 5,06 ppm, par rapport au signal relatif aux insaturations terminales de la chaîne latérale du motif HU (10) à 5,76 ppm (**Figure 40b**). Les pourcentages de conversion des insaturations en groupements sulfonates en fonction des ratios molaires initiaux sont regroupés dans la **Figure 41**.



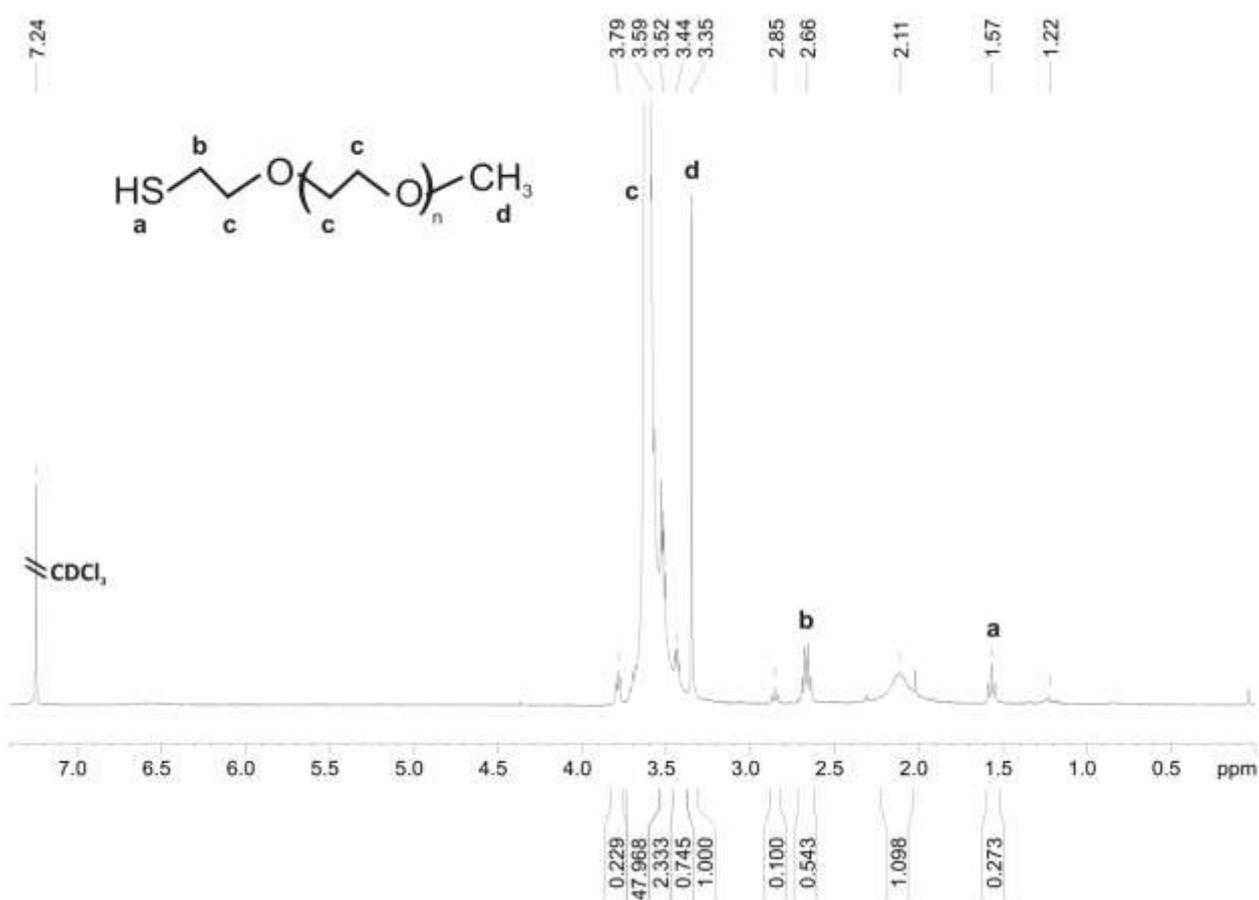
**Figure 41.** Conversions des insaturations latérales du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$ , en fonction des ratios molaires de  $\text{SO}_3^-$ , déterminées par RMN  $^1\text{H}$ .

Les résultats obtenus indiquent une relation non linéaire entre le taux de conversion des doubles liaisons en sulfonates et les concentrations en  $\text{SO}_3^-$  utilisées. L'emploi d'un équivalent de  $\text{SO}_3^-/\text{C}=\text{C}$  engendre 24% de conversion des insaturations, et une conversion supérieure à 60% est obtenue en présence de 1,2 équivalent de  $\text{SO}_3^-/\text{C}=\text{C}$ , jusqu'à atteindre une modification complète à 5 équivalents de  $\text{SO}_3^-/\text{C}=\text{C}$  (**Figure 41**). Les copolymères ont été

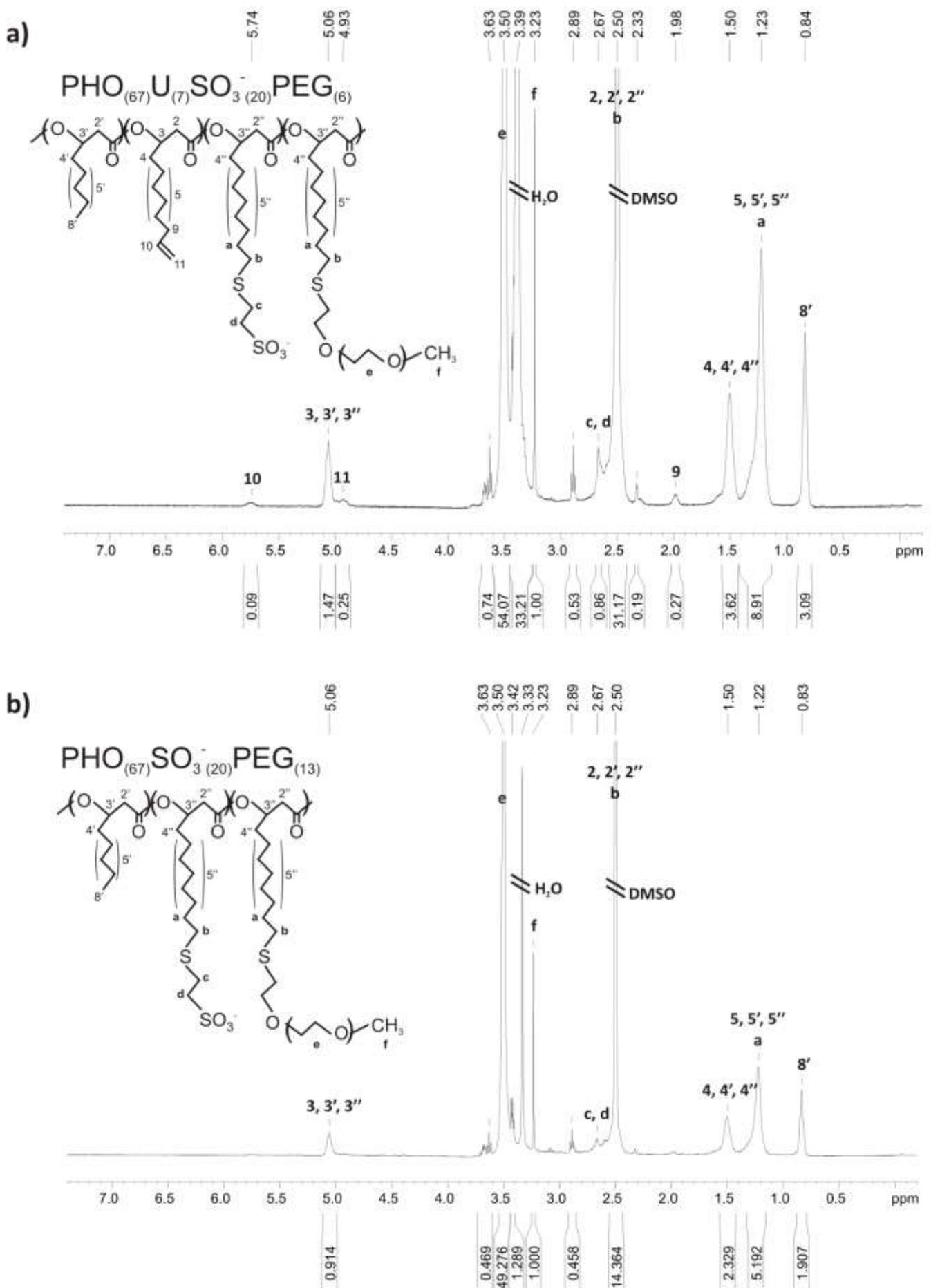
obtenus avec des rendements compris entre 86 et 95%, traduisant l'efficacité de la méthode de greffage.

Dans l'optique de conserver un nombre suffisant d'insaturations pour le greffage ultérieur de PEG méthyle éther thiol, nous avons décidé de synthétiser des copolymères contenant 20% de groupements sulfonates sur les 33% initiales que compte le  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$ . Le  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-_{(20)}$  est donc obtenu en utilisant 1,2 équivalent de  $\text{SO}_3^-/\text{C}=\text{C}$ .

Enfin, la solubilité du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-_{(20)}$  a été testée, à 10 g/L de copolymères dans quatre solvants différents ( $\text{CHCl}_3$ , THF, DMSO et  $\text{H}_2\text{O}$ ). Le copolymère n'est pas soluble dans l'eau, le THF ni même dans le  $\text{CHCl}_3$  comme classiquement avec les PHA natifs. En revanche, une complète solubilisation est observée dans le DMSO.



**Figure 42.** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du PEG méthyle éther thiol dans le  $\text{CDCl}_3$ .



**Figure 43.** Spectres RMN <sup>1</sup>H du PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>PEG<sub>(6)</sub> (a) et du PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>PEG<sub>(13)</sub> (b), dans le DMSO-d<sub>6</sub>.

### III. 3. 1. 2. Greffage de polymères de poly(éthylène glycol)

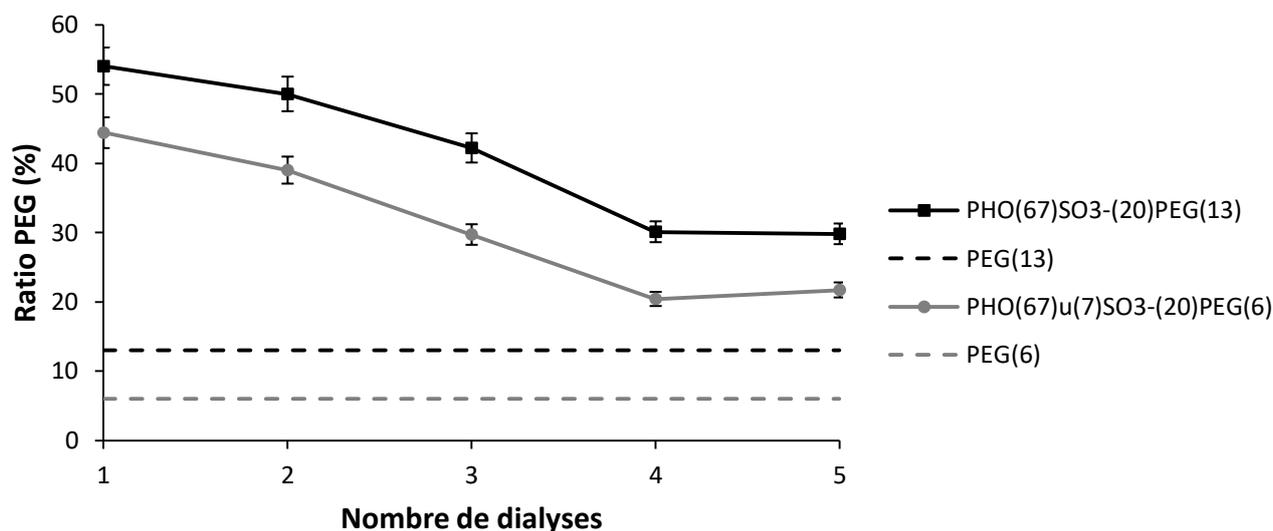
Dans un second temps et à partir de la même technique de réaction thiol-ène photoinduite, le polymère de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-(20)$  a été greffé avec du PEG méthyle éther fonctionnalisé par un groupement thiol. Le PEG de faible masse molaire est un polymère hautement polaire et hydrosoluble, largement utilisé en pharmacie pour ses propriétés de biocompatibilité mais également de furtivité, c'est-à-dire ayant pour capacité de devenir moins repérable au regard des cellules du système immunitaire (Alcantar *et al.*, 2000; Immordino *et al.*, 2006). Deux ratios différents de PEG méthyle éther thiol (3 et 8 équivalents molaires de PEG par mole d'insaturations du PHOU) ont été utilisés pour convertir tout ou partie des 13% d'insaturations restées vacantes du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-(20)$  (**Figure 39**). Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du PEG méthyle éther thiol (**Figure 42**) permet de déterminer une masse molaire de 1700 g/mol.

Par RMN  $^1\text{H}$ , deux pics sont observés à 3,50 et 3,23 ppm, correspondant relativement aux groupements méthylènes  $\text{CH}_2$  (e) et méthyle terminal  $\text{CH}_3$  (f) du PEG, confirmant ainsi le succès du greffage (**Figure 43**). Les pourcentages de greffage ont été calculés à partir des intégrations des protons affiliés au pic du CH (3, 3' et 3'') de la structure du PHOU à 5,06 ppm, et au signal relatif aux insaturations terminales de la chaîne latérale du motif HU (10) à 5,76 ppm. Deux ratios de PEG ont été mis en évidence, démontrant la synthèse de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  avec l'usage de 3 eq PEG/C=C, et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  lorsque 8 eq PEG/C=C ont été utilisés. Les rendements sont compris entre 90 et 94%.

Une certaine quantité de PEG non greffé au PHA subsiste, malgré de nombreuses étapes de purification par dialyse. Des variations de concentration de PHA dans le DMSO pendant la phase dialyse ont été entreprises, afin d'optimiser l'efficacité de la purification (**Tableau 11**). Ceci démontre clairement la nécessité de dialyser en conditions très diluées (2 g/L au maximum) et finalement, quatre cycles de dialyse ont été effectués dans le DMSO (**Figure 44**). Néanmoins, des ratios massiques de PEG libre compris entre 16 et 29% n'ont pu être éliminés.

**Tableau 11.** Ratio massique de PEG libres éliminés après dialyse, en fonction de la concentration du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  dans le DMSO.

[PHA] g/L	16,7	5	2	0,5
Ratio massique de PEG éliminé (%)	7,2	16,5	48	51



**Figure 44.** Ratios de PEG déterminés par RMN  $^1\text{H}$  à partir des copolymères  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  (gris) et  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  (noir), en fonction du nombre de dialyses effectuées.

Les chaînes de PEG en excès sont probablement liées de manière non covalente et enchâssées au sein des copolymères, éventuellement parmi les chaînes polaires de PEG d'ores et déjà fixées, et ce à des pourcentages d'autant plus élevés que la concentration initiale en PEG utilisée était importante. Des expériences de purification des copolymères vis-à-vis des polymères de PEG non greffés ont été testées par centrifugation. Néanmoins, après 10 min de centrifugation à 10000 rpm des copolymères dans l'eau ultra pure, aucune élimination du PEG en excès n'a été observée.

Les tests de solubilité menés démontrent une parfaite solubilisation des polymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , concentrés à 10 g/L, dans le DMSO et dans l'eau. L'objectif de développement de PHA hydrosolubles est atteint, et les copolymères ont été stockés à l'obscurité.

### III. 3. 1. 3. Caractérisations physico-chimiques

Les différents polymères ont été caractérisés par des méthodes physico-chimiques différentes. Le PEG méthyle éther thiol, le  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$  et les deux copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  ont été analysés par SEC de façon à déterminer leur masse molaire. Le  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(13)}\text{SO}_3^-(20)$  n'a pas pu être caractérisé par cette technique car il est uniquement soluble dans le DMSO. Cette analyse indique que le PEG méthyle éther thiol possède une masse molaire de l'ordre de 1700 g/mol (**Tableau 12**), correspondant à la valeur déterminée par RMN  $^1\text{H}$  (**Figure 42**). D'autre part, le  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$  a une masse molaire de 40000 g/mol, et un indice de polymolécularité plus élevé de 1,7, valeur généralement obtenue lorsque le PHA est biosynthétisé. Les copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  présentent quant à eux des masses molaires de respectivement 24000 et 29500 g/mol. Ces écarts de masses estimés par rapport au PHA natif (40000 g/mol) sont certainement dus aux différents échantillons utilisés pour l'étalonnage de l'analyse SEC (polystyrène et PEO), liés à la nature des éluants employés. Dans ce contexte, la comparaison des masses molaires s'avère plus délicate en raison de la différence des rayons de gyration des chaînes macromoléculaires, alors solubilisées dans différents solvants (Babinot *et al.*, 2011).

**Tableau 12.** Caractéristiques des polymères de PEG,  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$ ,  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ .

Polymère	Mn (g/mol)	PDI	Tg <sup>c</sup> (°C)	Tm <sup>d</sup> (°C)	ΔHm <sup>d</sup> (J/g)	
					PHA	PEG
PEG	1700 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	-	53	-	185
$\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$	40000 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	-40	44	14	-
$\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$	24000 <sup>b</sup>	1.1 <sup>b</sup>	-	49	-	82
$\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$	29500 <sup>b</sup>	1.1 <sup>b</sup>	-	52	-	132

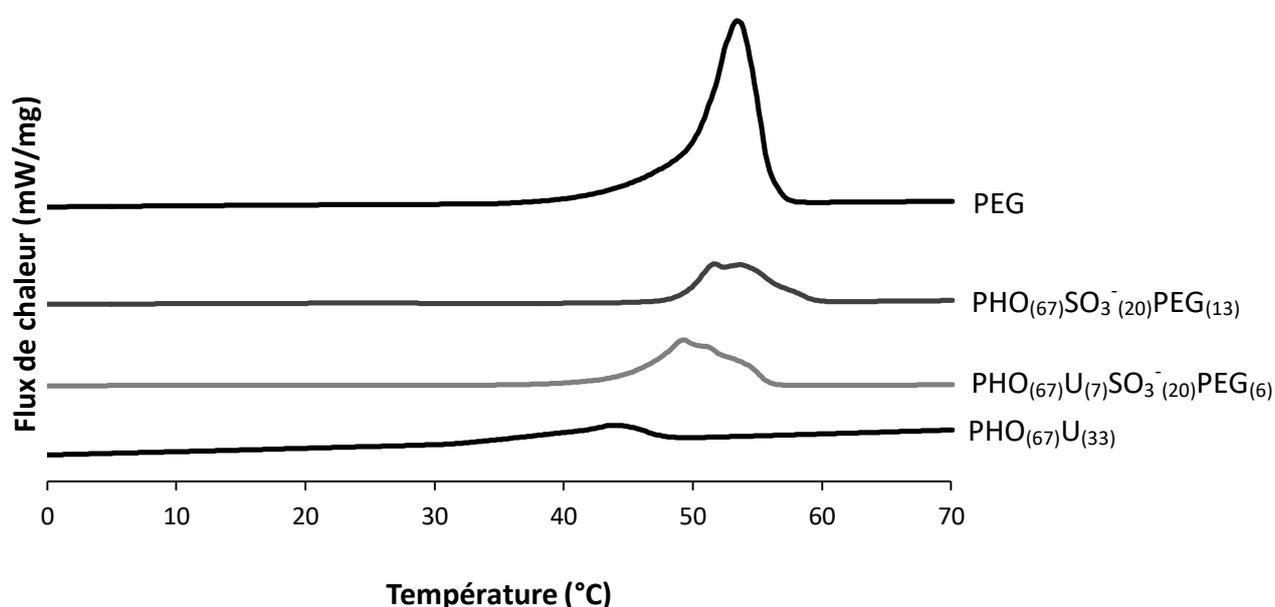
<sup>a</sup> Déterminé par SEC dans  $\text{CHCl}_3$

<sup>b</sup> Déterminé par SEC dans  $\text{H}_2\text{O}/\text{LiNO}_3^-$

<sup>c</sup> Déterminé à partir de la seconde phase de chauffage par DSC

<sup>d</sup> Déterminé à partir de la première phase de chauffage par DSC, pour les copolymères le ΔHm a été calculé selon la formule  $\Delta H = \Delta H_i/W_i$ , où  $\Delta H_i$  est l'aire du pic endothermique, et  $W_i$  est le poids des polymères de PHA ou PEG déterminé par  $^1\text{H}$  RMN.

D'autre part, les thermogrammes obtenus par DSC (**Figure 45**) confirment une structure semi-cristalline pour chacun des échantillons. Le PHOU est un polymère peu cristallin en comparaison du PEG. Des augmentations des températures de fusion et des enthalpies de fusion ont été observées pour les copolymères  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , en raison de la présence de PEG, jusqu'à quasiment atteindre la même température de fusion que le PEG seul (53°C) (**Tableau 12**). Toutefois, les valeurs des enthalpies de fusion des copolymères sont inférieures à celle du PEG libre, montrant ainsi une certaine action inhibitrice des PHA sur la cristallisation du PEG, phénomène d'ores et déjà observé dans le cadre de travaux similaires menés par Babinot *et al.* (2010). De même, la présence de polymères de PEG empêche la cristallisation du PHA.



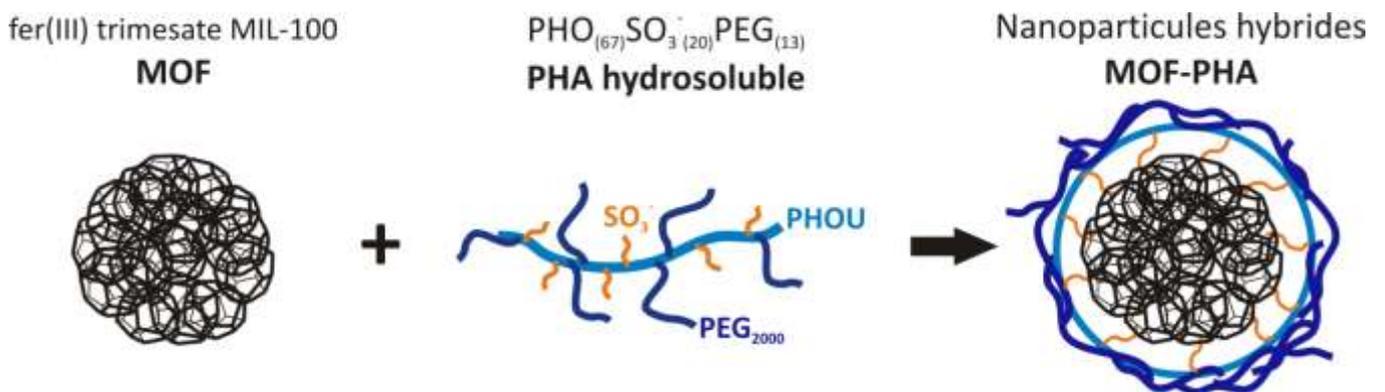
**Figure 45.** Thermogrammes du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(33)}$ , du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ , du  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  et du PEG.

En conclusion, une méthode efficace, rapide et reproductible de synthèse de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  hydrosolubles a été développée par deux réactions thiol-ène photoactivées successives. Ces deux copolymères seront utilisés pour le recouvrement de nanoparticules de type MOF.

## III. 3. 2. Synthèse de nanoparticules hybrides MOF-PHA

### III. 3. 2. 1. Caractérisations physico-chimiques

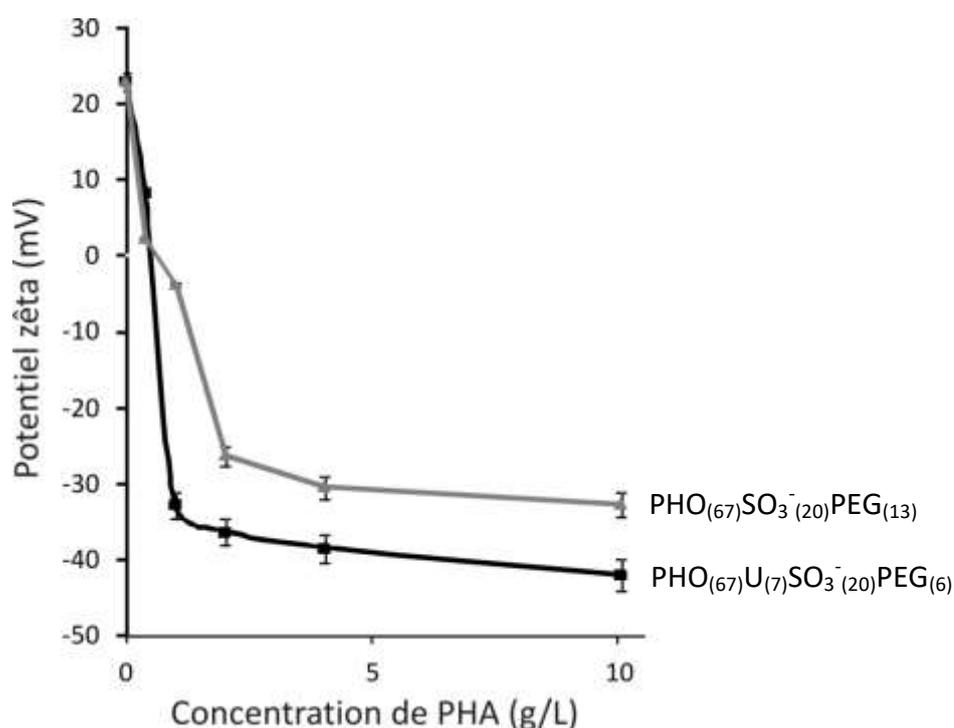
Les deux copolymères précédemment décrits ont été utilisés pour enrober des nanoparticules de type MOF MIL-100(Fe), afin de développer des systèmes hybrides poreux MOF-PHA (**Figure 46**). Les PHA synthétisés  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  ont été fonctionnalisés avec des groupements sulfonates  $\text{SO}_3^-$  polaires, pour promouvoir la liaison ionique non covalente, par simple imprégnation, des copolymères de PHA à la surface des nanoparticules de type MOF, composés d'ions  $\text{Fe}^{3+}$ . De plus, la présence de PEG vise à augmenter la stabilité du système en milieu physiologique, mais également à échapper aux cellules phagocytaires du système immunitaire (furtivité), et donc à augmenter le temps de circulation des nanoparticules dans l'organisme.



**Figure 46.** Schéma récapitulatif de la conception de nanoparticules hybrides MOF-PHA par imprégnation.

Afin d'établir la quantité nécessaire de PHA pour garantir le recouvrement optimal des MOF, et donc potentiellement la stabilité des nanoparticules hybrides en milieu aqueux, plusieurs concentrations de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  (0,4 ; 1 ; 2 ; 4 et 10 g/L) ont été mises dans de l'eau ultra pure au contact de 2 g/L de MOF. Les mesures de potentiel zêta, renseignant sur les charges électriques présentes à la surface des particules en solution, affichent une charge fortement électropositive, de +23 mV, pour les nanoparticules de type MOF natifs, et des charges électronégatives de -41 mV pour le

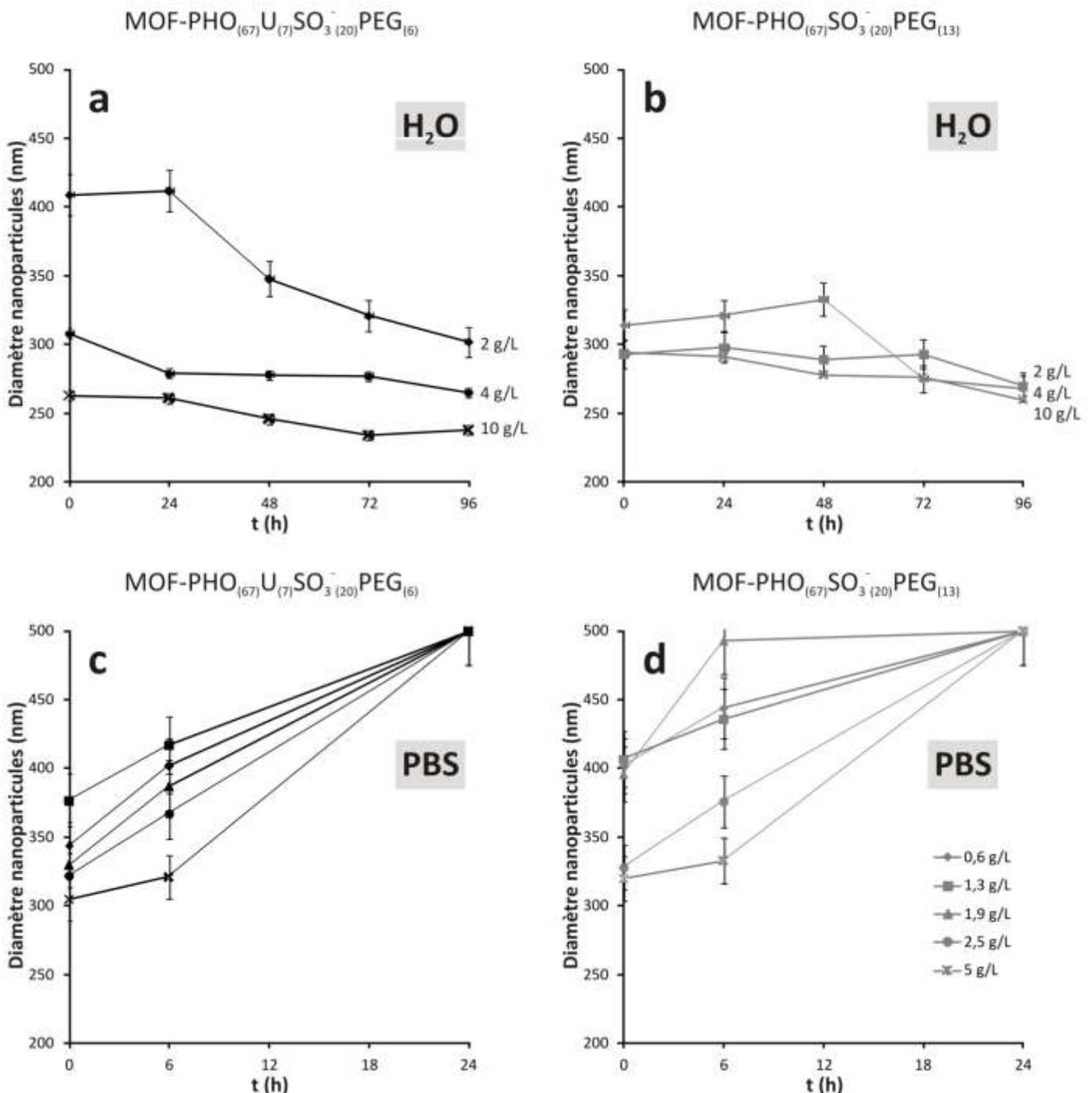
PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et de -24 mV pour le PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>. Les résultats montrent une diminution instantanée du potentiel zêta mesuré à la surface des nanoparticules au contact de 0,4 g/L de copolymères (comprise entre +2,3 et +8,3 mV) (**Figure 47**). Des valeurs négatives de charges de surface sont mesurées dès l'emploi de 1 g/L de copolymères ; de -3,8 à -32,7 mV pour les nanoparticules hybrides de MOF-PHO<sub>(67)</sub>UO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>, et de -32,8 à -42 mV pour les systèmes MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub>, confirmant ainsi le recouvrement des MOF par les copolymères de PHA fonctionnalisés.



**Figure 47.** Potentiel zêta des nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de copolymères de PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et de PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>, mesuré dans l'eau ultra pure.

Nous avons ensuite étudié la stabilité des particules formées au cours du temps dans l'eau ultra pure ou du tampon phosphate salin (PBS). Dans un premier temps, après incubation de 0,4 ; 1 ; 2 ; 4 ou 10 g/L de copolymères de PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et de PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub> au contact de 2 g/L de MOF dans l'eau, le diamètre et la dispersité des nanoparticules en suspension ont été mesurés par DLS (**Figure 48a et b**). La dispersion de nanoparticules de type MOF nus ou enrobés de 0,4 ou 1 g/L de copolymères de PHA (soit 0,2 ou 0,5 équivalent massique de MOF) dans l'eau semble provoquer l'agglomération immédiate des particules entre elles (en moins d'une heure). En effet, des diamètres

supérieurs à 1  $\mu\text{m}$  ont été mesurés par DLS pour ces trois échantillons (valeurs non indiquées sur la Figure 48), alors même que la taille d'un MOF natif est de 270 nm si stocké en conditions optimales. Ces résultats confirment ceux ayant montré l'instabilité des MOF en solution aqueuse (Seo *et al.*, 2012; Aykaç *et al.*, 2017). L'incubation des MOF en présence de 0,4 ou 1 g/L de PHA fonctionnalisés ne suffit pas à générer un recouvrement optimal pour garantir la stabilité des nanoparticules dans le temps.



**Figure 48.** Diamètres des nanoparticules hybrides MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>PEG<sub>(6)</sub> et MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>PEG<sub>(13)</sub> mesurés pendant 96 h dans l'eau ultra pure (a et b) et 24 h dans du tampon phosphate salin (PBS) à 37°C (c et d), en fonction des concentrations en copolymères. 142

D'autre part, l'emploi d'une concentration de 2 g/L de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(6)}$  et de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(13)}$  a permis l'élaboration de nanoparticules hybrides par simple imprégnation. Néanmoins, les diamètres mesurés par DLS se sont avérés hétérogènes, supérieurs aux 270-300 nm attendus durant les 48 premières heures (**Figure 48a et b**). Ces données traduisent à nouveau une certaine agrégation des particules entre elles et de fait, un recouvrement insuffisant des PHA à la surface des MOF pour assurer une pérennité des systèmes.

Les meilleurs résultats en matière de stabilité des nanoparticules hybrides en milieu aqueux ont été obtenus avec l'usage de 4 et 10 g/L de PHA au contact de 2 g/L de MOF (soit 2 et 5 équivalents massiques), et ceci quel que soit le copolymère ( $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(6)}$  ou  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(13)}$ ). En effet, des diamètres cohérents et relativement stationnaires de nanoparticules compris entre 310 et 250 nm ont été mesurés par DLS sur une période de 48 h, traduisant une agrégation limitée des particules entre elles en parallèle de la stabilité de la suspension. Ainsi, compte tenu de la concentration jugée idéale en PHA, fixée à 4 g/L (2 eq MOF) dans le cadre de ces travaux, il semblerait que la mesure d'un potentiel zêta compris entre -30 et -38 mV corresponde à un paramètre fort et indicateur associé au recouvrement optimal des PHA fonctionnalisés à la surface des MOF, pour assurer la stabilité des nanoparticules hybrides en milieu aqueux.

Dans un second temps, la mesure par DLS des diamètres de nanoparticules de type MOF enrobés de 0,6 ; 1,3 ; 1,9 ; 2,5 ou 5 g/L de PHA fonctionnalisés a été menée dans du liquide physiologique (PBS) à 37°C pendant 24 h, de manière à évaluer la stabilité des nanoparticules hybrides MOF-PHA en conditions salines et phosphatées (**Figure 48c et d**). En effet, l'assurance du maintien des nanoparticules hybrides dans une solution tampon est essentielle, puisque les nanoparticules de type MOF sont rapidement dégradées par tout élément phosphate ou salin (Horcajada *et al.*, 2010).

Les mesures de diamètres réalisées sur les nanoparticules hybrides ont démontré des tendances similaires à celles obtenues dans l'eau ultra pure. En effet, les nanoparticules les plus stables en matière de taille sont celles incubées en présence de concentrations plus élevées en PHA fonctionnalisés. En d'autres termes, les MOF imprégnés de 5 g/L de copolymères ont montré des diamètres initiaux de 305 nm ( $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(6)}$ ) et

de 320 nm (MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>), inférieurs à ceux relevés à partir des autres échantillons, et relativement proches de ceux obtenus à partir des MOF enrobés de 4 g/L de copolymères en milieu aqueux (300 nm).

D'autre part, le diamètre mesuré sur chaque type de nanoparticule augmente au bout de 6 h, de façon d'autant plus importante que le recouvrement des MOF en PHA fonctionnalisés était faible. La solution tampon saline semble donc influencer la structure des nanoparticules hybrides PHA-MOF, de manière opposée à la simple incubation dans l'eau. Toutefois, les nanoparticules de type MOF imprégnés de 5 g/L de PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> ou de PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub> sont restées stables pendant plus de 6 h dans du tampon physiologique, période pendant laquelle tout type de nanoparticule à visée thérapeutique se doit de demeurer intacte, afin d'empêcher la délivrance prématurée de molécules actives dans l'organisme, avant d'avoir atteint les cellules pathologiques cibles.

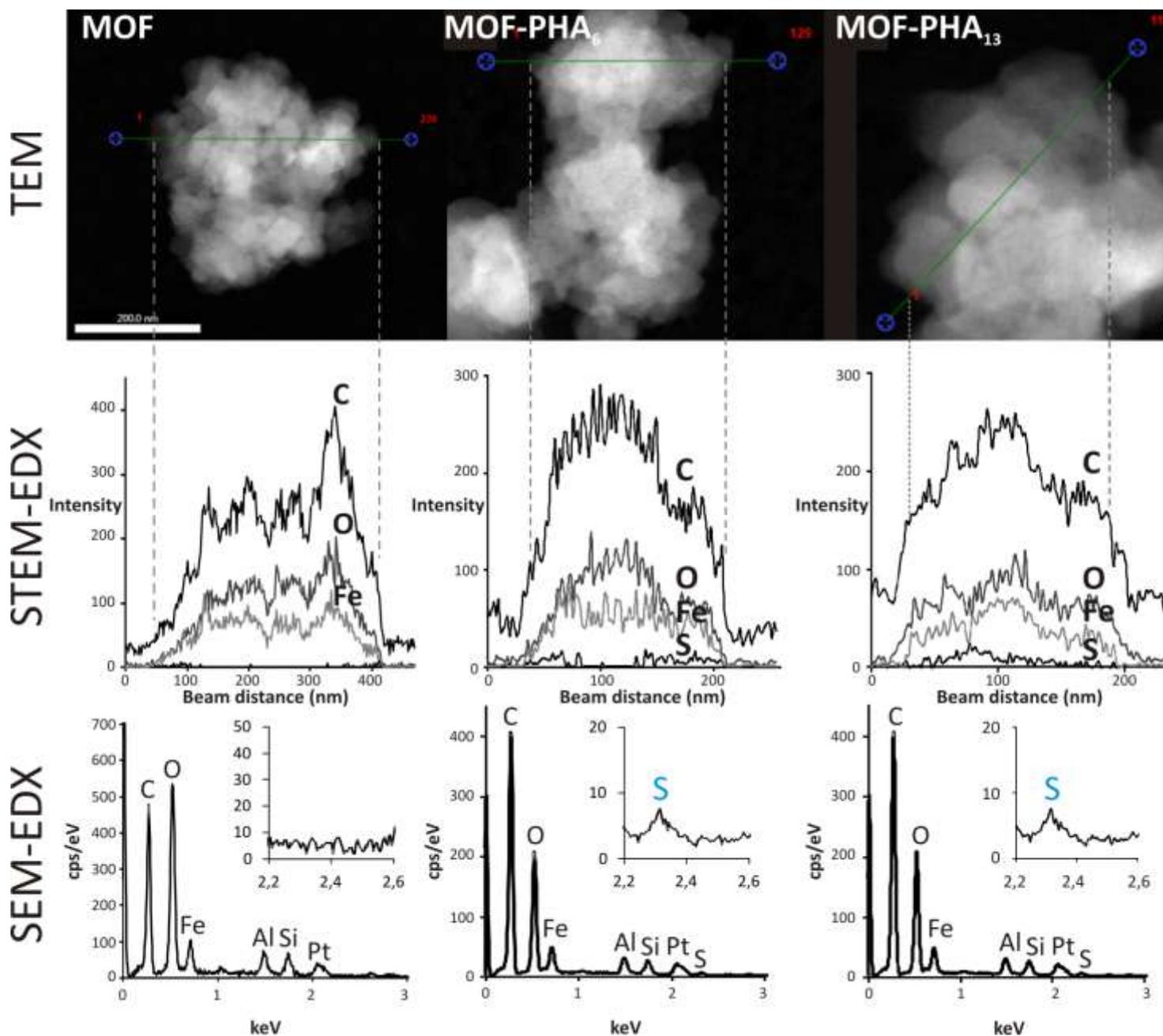
En conclusion, ces expériences de stabilité des nanoparticules hybrides menées à la fois dans l'eau et le PBS préconisent toutes deux l'emploi de 4 à 5 g/L de PHA fonctionnalisés pour assurer l'enrobage optimal de 2 g/L de nanoparticules de type MOF, et ce sur une période minimale de 6 h. Ces expériences de stabilité offrent des résultats encourageants, et valident l'usage de ces nouvelles nanoparticules hybrides poreuses MOF-PHA dans un milieu de culture, c'est-à-dire composé de sels et de protéines, au contact de cellules phagocytaires.

Cependant, ces différents travaux n'ont pour l'heure pas permis de définir et de sélectionner un copolymère plus approprié que l'autre, puisque des résultats identiques ont été obtenus. Ainsi, les deux types de systèmes hybrides poreux MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub> seront testés et caractérisés de manière équivalente durant la suite de cette étude.

### III. 3. 2. Caractérisation par microscopie

Des images de microscopie électronique à transmission (TEM) ont été effectuées sur les MOF natifs et les deux types de nanoparticules hybrides MOF-PHA synthétisées, MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>. Le recouvrement des nanoparticules de type MOF par les copolymères fonctionnalisés ne semble impacter ni la morphologie, ni la taille des nanoparticules puisque des diamètres moyens compris entre 250 et 300 nm ont été mesurés (**Figure 49**).

Les proportions d'atomes de C, O, Fe et S ont été quantifiées par techniques STEM-EDX et SEM-EDX à la surface des mêmes échantillons. La présence d'atomes de soufre, composés marqueurs des copolymères de PHA, est mesurée à la surface des deux types de nanoparticules hybrides, à des pourcentages atomiques équivalents à partir des deux techniques (0,8%) (**Figure 49 et Tableau 13**).



**Figure 49.** Clichés de TEM et proportions atomiques relevées par SEM et STEM-EDX à partir de nanoparticules de type MOF nus, enrobés de 4 g/L de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ .

**Tableau 13.** Compositions atomiques moyennes des nanoparticules de type MOF natifs ou imprégnés de 4 g/L de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , déterminées par STEM-EDX et SEM-EDX, comparées à la composition élémentaire des MOF calculée par XPS.

Nanoparticules		C (%)	O (%)	Fe (%)	S (%)	Ratio C/Fe	Ratio S/Fe
XPS	MOF (Agostoni <i>et al.</i> , 2015)	57,4	34,9	7,7	0,0	7,5	0,00
STEM-EDX	MOF	74,6	18,8	6,4	0,0	11,6	0,00
	MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$	76,7	16,6	5,9	0,8	12,9	0,13
	MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$	77,7	16,4	5,2	0,8	15,1	0,16
SEM-EDX	MOF	55,2	38,3	6,5	0,0	8,5	0,00
	MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$	69,2	23,0	6,9	0,9	10,0	0,13
	MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$	70,0	22,9	6,3	0,8	11,1	0,13

L'augmentation du ratio C/Fe est d'autant plus importante que le pourcentage de PEG est élevé au sein des copolymères, ceci correspond à des taux de 12,9 puis de 15,1 (STEM-EDX), et de 8,5, 10 et 11,1 (SEM-EDX), avant et après recouvrement des MOF par 4 g/L de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  ou de  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$  (**Tableau 13**).

De plus, des ratios moyens S/Fe ont été calculés de manière très similaire à partir des deux techniques STEM-EDX et SEM-EDX (0,13 - 0,16), correspondant à un atome de soufre marqueur des copolymères fonctionnalisés pour huit atomes de fer appartenant aux MOF. Ces résultats confirment l'adsorption des copolymères de PHA fonctionnalisés à la surface des nanoparticules de type MOF.

### III. 3. 3. Etude de la biocompatibilité des nanoparticules hybrides

#### MOF-PHA

##### III. 3. 3. 1. Cytotoxicité des nanoparticules hybrides MOF-PHA vis-à-vis d'une lignée immunitaire phagocytaire

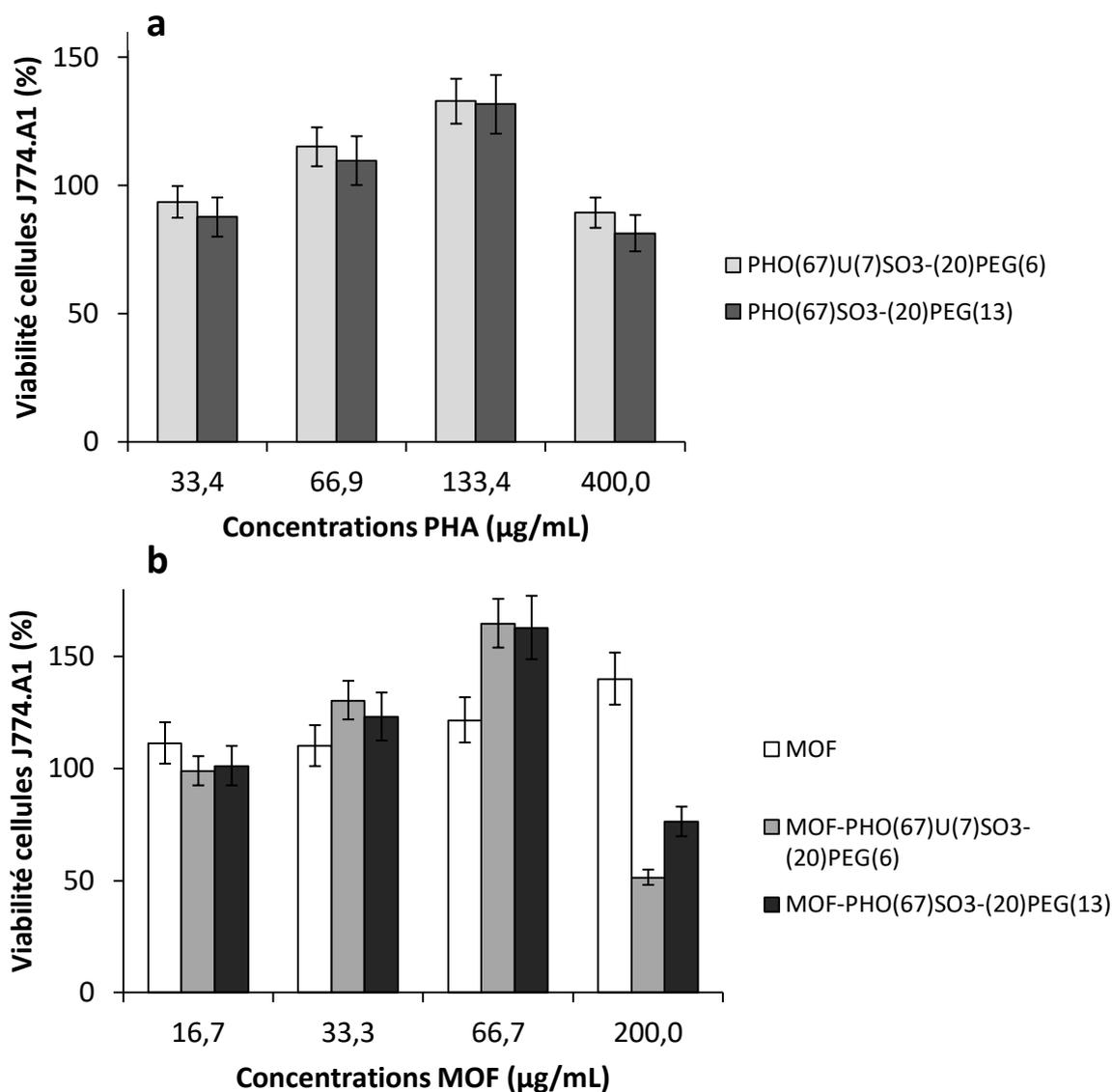
Les nanoparticules hybrides MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub> de diamètre proche des 300 nm et stables pendant au moins 6 h en milieu physiologique tamponné, constituent une nouvelle génération de nanovecteurs à visée thérapeutique, dont il convient d'évaluer la biocompatibilité vis-à-vis de l'organisme. La non-toxicité de ces nanoparticules hybrides MOF-PHA au contact d'une lignée de cellule a été déterminée, à l'aide de deux tests de cytotoxicité CytoTox Fluor (Promega) et LDH (Roche), et d'un test de prolifération cellulaire RealTime Glo (Promega) commerciaux.

Les tests ont été effectués sur des cellules de type macrophage, car celles-ci incarnent la première ligne de défense du système immunitaire au regard des particules non reconnues par l'organisme, en pratiquant la phagocytose, c'est-à-dire l'ingestion et la destruction des agents étrangers, pathogènes présents dans le milieu (Aderem and Underhill, 1999).

Les cellules phagocytaires murines J774.A1 ont été sélectionnées pour ces tests car celles-ci sont des cellules modèles, couramment employées en biologie cellulaire et immunologie, génétiquement stables et particulièrement réactives en présence d'agents pathogènes (Lam *et al.*, 2009). Enfin, le comportement des cellules J774.A1 au contact des PHA fonctionnalisés ou nanoparticules de type MOF natifs ou hybrides a été étudié par microscopie confocale à balayage laser.

Dans un premier temps, la cytotoxicité des composés a été calculée, pour la première fois, à l'aide du kit CytoTox Fluor (Promega), permettant de mesurer la fluorescence émise par le réactif bis-AAH-R110, dépendant de l'activité protéase émise en cas de lyse cellulaire. Le pourcentage de cellules J774.A1 viables a été déterminé pour chaque condition expérimentale, et comparé au taux de viabilité physiologique des macrophages, directement

lié au phénomène naturel d'apoptose des cellules en conditions de culture optimales (témoin négatif, non traité dans le Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM).



**Figure 50.** Viabilité des cellules J774.A1 calculée à partir du test CytoTox Fluor (Promega), en fonction des concentrations en copolymères (a) ou en nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés de PHA fonctionnalisés (b), après 24 h d'incubation. DMEM utilisé comme contrôle (100%), expériences réalisées en triplicat.

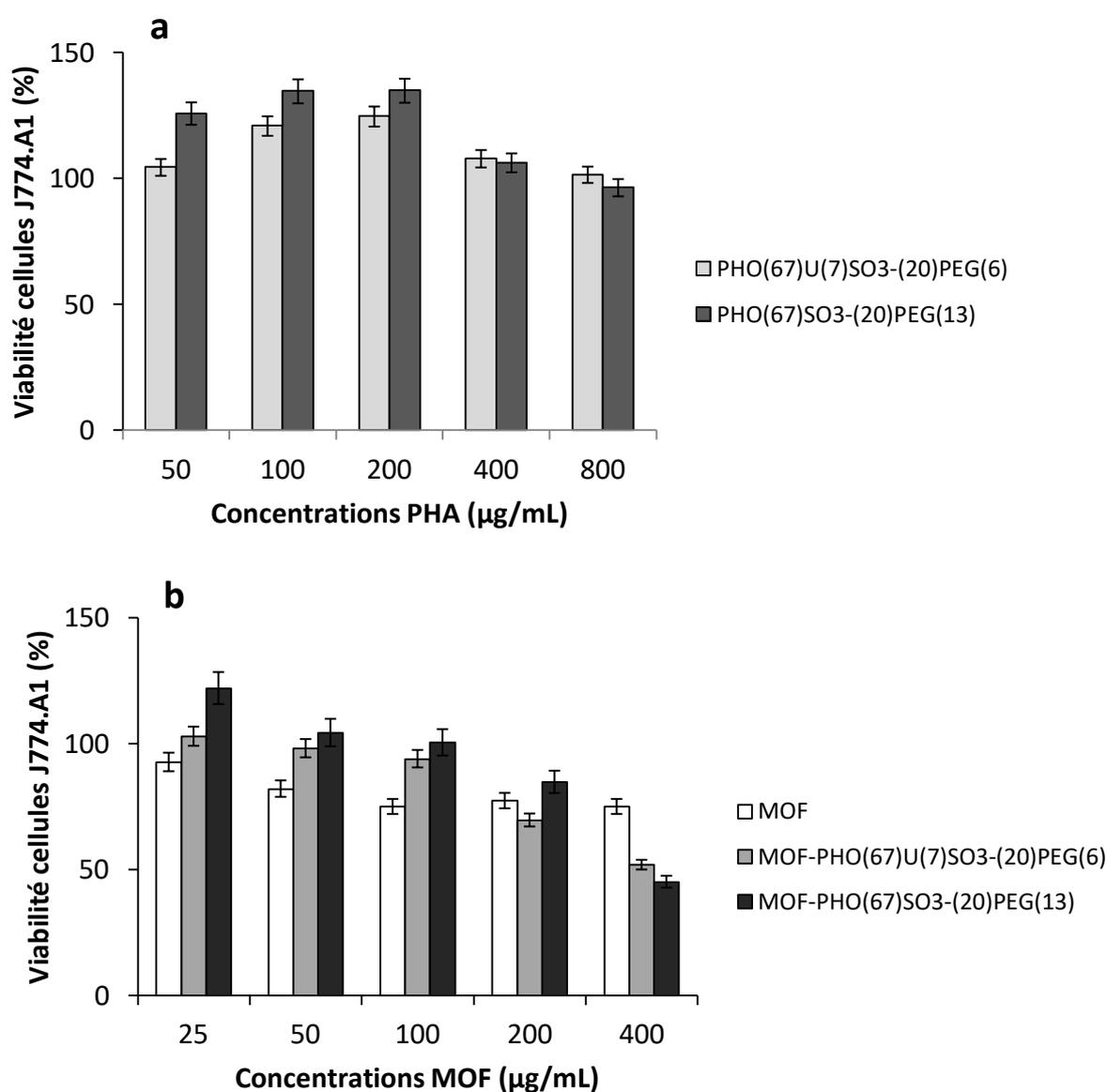
Deux équivalents massiques de PHA fonctionnalisés par rapport aux nanoparticules de type MOF ont été employés durant ces expériences, pour garantir la stabilité des systèmes hybrides poreux MOF-PHA, comme démontré précédemment. Au bout de 24 h d'incubation des macrophages en présence de 33,4 ; 66,9 ; 133,4 ou 400  $\mu\text{g/mL}$  de PHA

fonctionnalisés, les résultats présentés en **Figure 50a** indiquent une hausse constante de la viabilité des cellules J774.A1 à des concentrations comprises entre 33,4 et 133,4 µg/mL, inférieure à 90%, jusqu'à atteindre 132,9% ( $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ ) et 131,7% ( $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ ), par rapport au taux de viabilité cellulaire physiologique des cellules J774.A1 (100%). En revanche, une certaine toxicité est observée dès l'emploi de 400 µg/mL de PHA, traduite par une diminution du nombre de cellules de l'ordre de 89,7% pour le  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et 81,4% pour le  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ .

D'autre part, l'incubation de macrophages en présence de 16,7 ; 33,3 ; 66,7 ou 200 µg/mL de nanoparticules de type MOF natifs a montré pour chaque expérience des pourcentages de viabilité supérieurs à 110% (compris entre 110 et 140%) par rapport au taux de viabilité cellulaire physiologique des cellules J774.A1 (100%) (**Figure 50b**). Ces résultats coïncident avec de précédents travaux ayant démontré la biocompatibilité des nanoparticules de type MOF MIL-100, mais à des concentrations bien supérieures à celles annoncées (Agostoni *et al.*, 2015). L'administration de 16,7 à 66,7 µg/mL de nanoparticules de type MOF enrobés de deux équivalents massiques de PHA a également généré une hausse constante de la viabilité des cellules J774.A1 jusqu'à atteindre des valeurs de 164,6% ( $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$ ) et de 162,7% ( $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ ), par rapport au taux rapporté avec les macrophages non traités (100%). Ces très forts taux de viabilité pourraient en partie s'expliquer par un processus d'activation immunitaire, traduit par la multiplication des macrophages J774.A1 au contact des nanoparticules (Jenkins *et al.*, 2011; Rószler, 2015), à des concentrations inférieures à 66,7 µg/mL pour les systèmes hybrides MOF-PHA et au moins égales à 200 µg/mL pour les MOF natifs.

Par contre, les nanoparticules hybrides ont provoqué une lyse significative des cellules J774.A1 par rapport au témoin à 200 µg/mL (51,3 à 76,2%). Ce renversement de tendance soudain démontre alors la toxicité des PHA fonctionnalisés adsorbés à la surface des nanoparticules de type MOF. Ainsi, les résultats obtenus à l'aide du test de cytotoxicité CytoTox Fluor indiquent une absence de toxicité des nanoparticules de type MOF natifs jusqu'à au moins une concentration de 200 µg/mL, jusque 133,4 µg/mL pour les PHA fonctionnalisés libres, et de l'ordre de 66,7 µg/mL pour nanoparticules hybrides MOF-PHA (soit un équivalent de 133,4 µg/mL de copolymères).

Un second test de cytotoxicité couramment employé dans le cadre d'études similaires, a été mené à l'aide du kit LDH (Roche). Celui-ci permet également de quantifier les cellules endommagées, par dosage de l'enzyme lactate déhydrogénase par absorbance. Ainsi et tenant compte du taux d'apoptose physiologique du même témoin (cellules J774.A1 non traitées), les pourcentages de viabilité cellulaire au contact de 25 ; 50 ; 100 ; 200 ou 400  $\mu\text{g/mL}$  de MOF natifs ou enrobés de deux équivalents massiques de copolymères fonctionnalisés, et de 50 ; 100 ; 200 ; 400 ou 800  $\mu\text{g/mL}$  de PHA fonctionnalisés ont été mesurés (**Figure 51**).



**Figure 51.** Viabilité des cellules J774.A1 calculée à partir du test LDH (Roche), en fonction des concentrations en copolymères (a) ou en nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés de PHA fonctionnalisés (b), après 24 h d'incubation. DMEM utilisé comme contrôle (100%), expériences réalisées en triplicat.

De manière générale, les résultats obtenus à l'aide du test LDH diffèrent de ceux obtenus à partir du kit CytoTox Fluor, en plusieurs points. En effet, les copolymères de PHA fonctionnalisés ne semblent pas engendrer de réaction de toxicité particulière vis-à-vis des macrophages J7774.A1 pour des concentrations inférieures à 50 µg/mL, puisque des taux de viabilité cellulaire proches des 100% ont été observés (**Figure 51a**). Cependant, un effet prolifératif des macrophages a été mesuré dès l'administration de 100 µg/mL de copolymères fonctionnalisés. Cette tendance pourrait s'expliquer par des processus de stimulation immunitaire des macrophages J774.A1, qui devront faire l'objet d'analyses complémentaires.

D'autre part, une viabilité cellulaire constante supérieure à 75% par rapport au taux physiologique (100%) est notée dès l'administration de concentrations en nanoparticules de type MOF natifs supérieures à 50 µg/mL (**Figure 51b**). Ces données démontrent un effet toxique modéré des MOF natifs à des concentrations identiques à celles indiquées dans le cadre de précédentes études (50 µg/mL), sans pour autant atteindre la valeur IC<sub>50</sub> d'origine, ultérieurement estimée à 300 µg/mL (concentration en composés pour laquelle 50% de la population cellulaire est endommagée). Enfin, l'emploi de nanoparticules hybrides MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub> à des concentrations comprises entre 25 et 100 µg/mL ne provoque aucune réaction significative de la part des cellules J774.A1, puisque des pourcentages de viabilité cellulaire proche du taux physiologique sont mesurés. *A contrario*, l'administration de nanoparticules hybrides à des doses plus importantes engendre une diminution de la viabilité des macrophages, comprise entre 69,6 et 84,7% à 200 µg/mL, et atteint la valeur IC<sub>50</sub> après incubation 24 h au contact de 400 µg/mL de nanoparticules.

Le test LDH mesurant par absorbance l'activité des enzymes lactate deshydrogenases, issues des cellules endommagées, démontre des résultats différents de ceux obtenus à l'aide du kit CytoTox Fluor, mais probablement plus cohérents dans le sens où ceux-ci sont dose-dépendants. Autrement dit, des augmentations des taux de mortalité cellulaire proportionnelles aux concentrations en composés MOF, copolymères ou nanoparticules hybrides délivrées ont été calculées. Ces différences prononcées observées entre ces deux tests laissent à penser que le kit CytoTox Fluor ne serait peut-être pas adapté dans le cadre d'expériences impliquant des nanoparticules hautement poreuses de type

MOF. En effet, les MOF sont connus pour leurs capacités d'absorption de tout type de molécules au travers de leurs pores volumineux (5,6 et 8,6 Å) (Agostoni *et al.*, 2015). Il est donc probable que le ligand bis-AAF-R110 spécifique du kit CytoTox Fluor et initiant le signal fluorescent au contact des cellules lysées, soit adsorbé au sein des nanoparticules de type MOF. Selon cette hypothèse et en l'absence de ligand bis-AAF-R110 fonctionnel en contact direct avec le milieu de culture, le signal fluorescent est amoindri, de manière d'autant plus importante que la concentration en MOF est élevée. Au même titre, il est également plausible que les copolymères de PHA fonctionnalisés inhibent les réactions chimiques associées au ligand de ce kit de cytotoxicité, par le biais d'un mécanisme encore non expliqué.

En conclusion et tenant compte des résultats obtenus à partir du kit LDH (Roche), la toxicité des nanoparticules de type MOF natifs est démontrée dès l'administration de concentrations supérieures à 50 µg/mL au regard des macrophages murins J774.A1 (>75% de viabilité cellulaire). D'autre part, l'usage de fortes quantités de copolymères de PHA fonctionnalisés (quelle que soit la formule) n'a pas eu d'impact sur la viabilité des macrophages, les PHA semblent donc biocompatibles, même administrés à une concentration de 800 µg/mL. Enfin, les expériences menées à partir des nanoparticules hybrides MOF-PHA n'ont quant à elles démontré aucune mortalité cellulaire significative pour une administration jusque 100 µg/mL, soit une concentration bien supérieure à celle observée avec les MOF natifs (50 µg/mL), et établi une valeur IC<sub>50</sub> égale à 400 µg/mL. Par ailleurs, aucune différence significative en termes de cytotoxicité n'a été observée entre les deux copolymères  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , libres ou adsorbés à la surface des nanoparticules de type MOF.

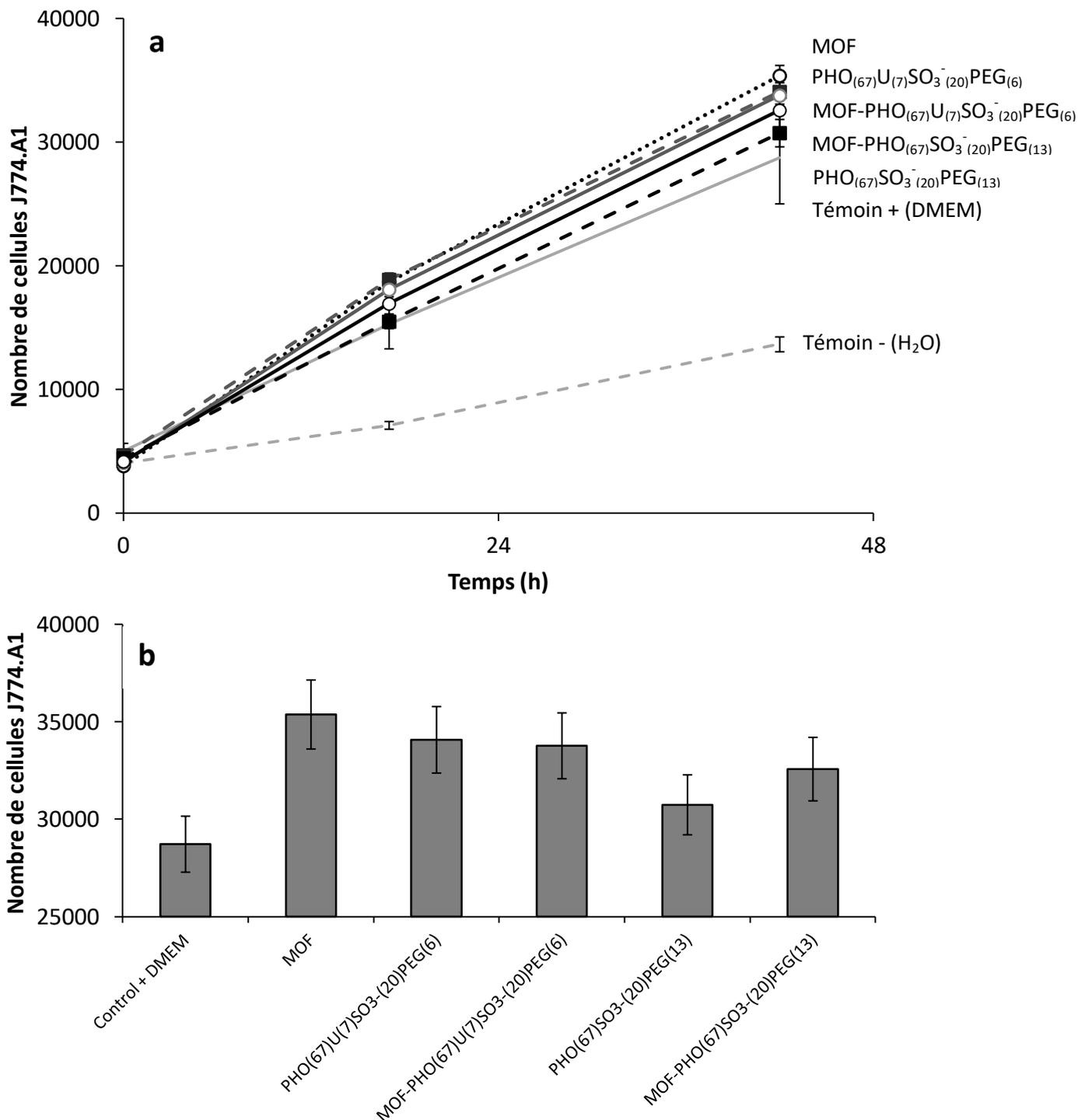
Au vu de la stabilité *in vitro*, de l'absence de toxicité à une concentration de 100 µg/mL et de la valeur IC<sub>50</sub> élevée des nanoparticules MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et MOF- $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , il apparaît est tout à fait envisageable d'employer ces nouvelles nanoparticules hybrides MOF-PHA dans le cadre d'expériences complémentaires, à des fins biomédicales.

### III. 3. 3. 2. Etude de la prolifération d'une lignée immunitaire phagocytaire au contact de nanoparticules hybrides MOF-PHA

La prolifération des cellules immunitaires de type macrophage est un phénomène marqueur de l'activation phagocytaire, étape précédant la réaction inflammatoire (Jenkins *et al.*, 2011; Rószler, 2015). La division des cellules J774.A1 au contact de 25 ; 50 ou 100 µg/mL de PHA fonctionnalisés et nanoparticules de type MOF natifs ou hybrides a été mesurée sur une période de 42 h. Les expériences de prolifération cellulaire ont été menées, pour la première fois, à l'aide du kit RealTime Glo (Promega). Ce dernier permet la quantification des cellules vivantes à partir de la bioluminescence émise du substrat luciférase, réduit par l'activité enzymatique de toute cellule viable.

Les résultats obtenus après 42 h d'incubation des macrophages J774.A1 au contact de 50 µg/mL de copolymères de PHA ou de MOF nus ou hybrides sont présentés en **Figure 52a**. Ces valeurs sont tout à fait comparables à celles relevées après administration des composés à des concentrations inférieures ou supérieures (25 ou 100 µg/mL) et ont été rassemblées sous forme de moyenne dans la **Figure 52b**. La prolifération cellulaire la plus importante par rapport à la population témoin non traitée (DMEM) est relevée après incubation des macrophages en présence de nanoparticules de type MOF nus, alors que la multiplication cellulaire la plus faible est observée au niveau de macrophages témoins sujets au choc osmotique (H<sub>2</sub>O).

Toutes concentrations confondues, une augmentation du développement des macrophages de l'ordre de 21% a été mesurée après 42 h d'incubation au contact des MOF natifs, de 18 et 15% en présence de nanoparticules hybrides MOF-PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et MOF-PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>, puis de 14 et 8% au contact des copolymères de PHO<sub>(67)</sub>U<sub>(7)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(6)</sub> et de PHO<sub>(67)</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup><sub>(20)</sub>PEG<sub>(13)</sub>.



**Figure 52.** Nombre de cellules J774.A1 viables déterminé par le test RealTime Glo pendant 42 h en présence de copolymères de PHA fonctionnalisés ou de nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés.

Ces résultats démontrent une prolifération cellulaire significative des macrophages J774.A1, probablement associée à un phénomène d'activation phagocytaire, principalement au contact des nanoparticules de type MOF natifs, puis dans de plus faibles proportions en présence de nanoparticules hybrides MOF-PHA, et de PHA fonctionnalisés. Par ailleurs, ces

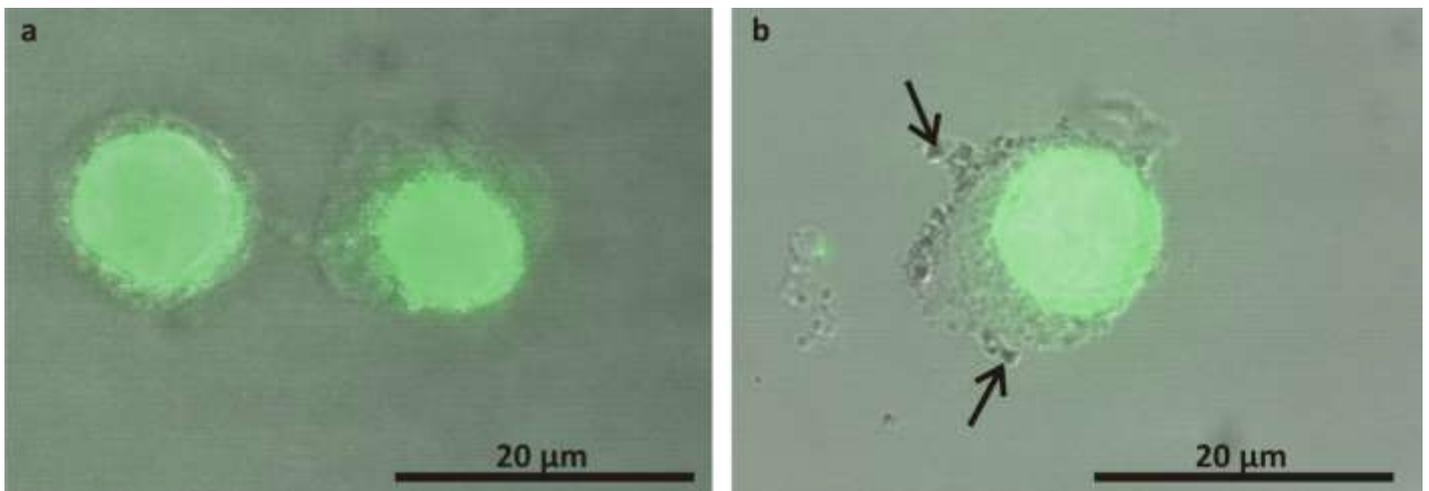
observations concordent en tout point avec les expériences de cytotoxicité réalisées à partir du kit LDH, indiquant une cytotoxicité amoindrie des nanoparticules de type MOF recouvertes de PHA fonctionnalisés par rapport aux MOF non enrobés.

A ce jour, les travaux relatifs aux processus de réaction inflammatoire causés par les nanoparticules de type MOF MIL-100 sont encore préliminaires (Bellido *et al.*; Baati *et al.*, 2013; Giménez-Marqués *et al.*, 2018). En revanche, de précédentes études portées sur la division et le processus d'inflammation des macrophages en relation avec des PHA menées *in vitro* et *in vivo* n'ont relaté que des processus de réaction inflammatoire locaux et modérés au niveau des phagocytes, et ont ainsi conclu à leur emploi favorable à des fins biomédicales (Volova *et al.*, 2003; Köse *et al.*, 2004; Chen and Wu, 2005; Misra *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014). Concernant cette étude, il est à ce jour impossible de confirmer ou d'infirmer avec certitude un quelconque phénomène d'inflammation immunitaire, puisque les techniques employées ne permettent ni la mise en évidence, ni le dosage des molécules impliquées dans la réaction inflammatoire générée par les macrophages, telles les cytokines proinflammatoires facteur de nécrose tumorale TNF- $\alpha$  ou interleukines IL-1, IL-6 ou IL-8 (Fujiwara and Kobayashi, 2005; Han *et al.*, 2016).

En conclusion, l'usage des tests de cytotoxicité LDH (Roche) et de prolifération cellulaire RealTime Glo (Promega) menés sur des macrophages murins J774.A1 a montré la non toxicité des matériaux d'intérêt à des concentrations inférieures à 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les nanoparticules de type MOF nus, à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pour les systèmes hybrides poreux MOF-PHA et plus de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (2 équivalents massiques de PHA soit 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pour les PHA fonctionnalisés libres. De plus, ces tests de biologie cellulaire ont permis d'exprimer une légère préférence pour le copolymère  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ , ayant induit une multiplication cellulaire, potentiellement associée à une activation phagocytaire, moins élevée que celle observée au contact du  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  (respectivement 8 et 14%). Cependant, les expériences de cytotoxicité et de prolifération cellulaire ont délivré des résultats identiques concernant les nanoparticules hybrides ( $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et  $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ ), et n'ont donc pas conclu à la sélection de l'une ou l'autre des deux formules.

### III. 3. 4. Comportement d'une lignée immunitaire phagocytaire au contact de nanoparticules hybrides MOF-PHA

Le dernier objectif de cette thèse consistait à observer le comportement des cellules immunitaires macrophages murins J774.A1 au contact des copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(6)}$  et des nanoparticules de type MOF nus ou hybrides  $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-$   $_{(20)}\text{PEG}_{(6)}$ , à l'aide de la microscopie confocale à balayage. Cette technique permet d'observer l'internalisation de corps étrangers marqués de fluorophores dans le cytoplasme de cellules fixées ou vivantes.

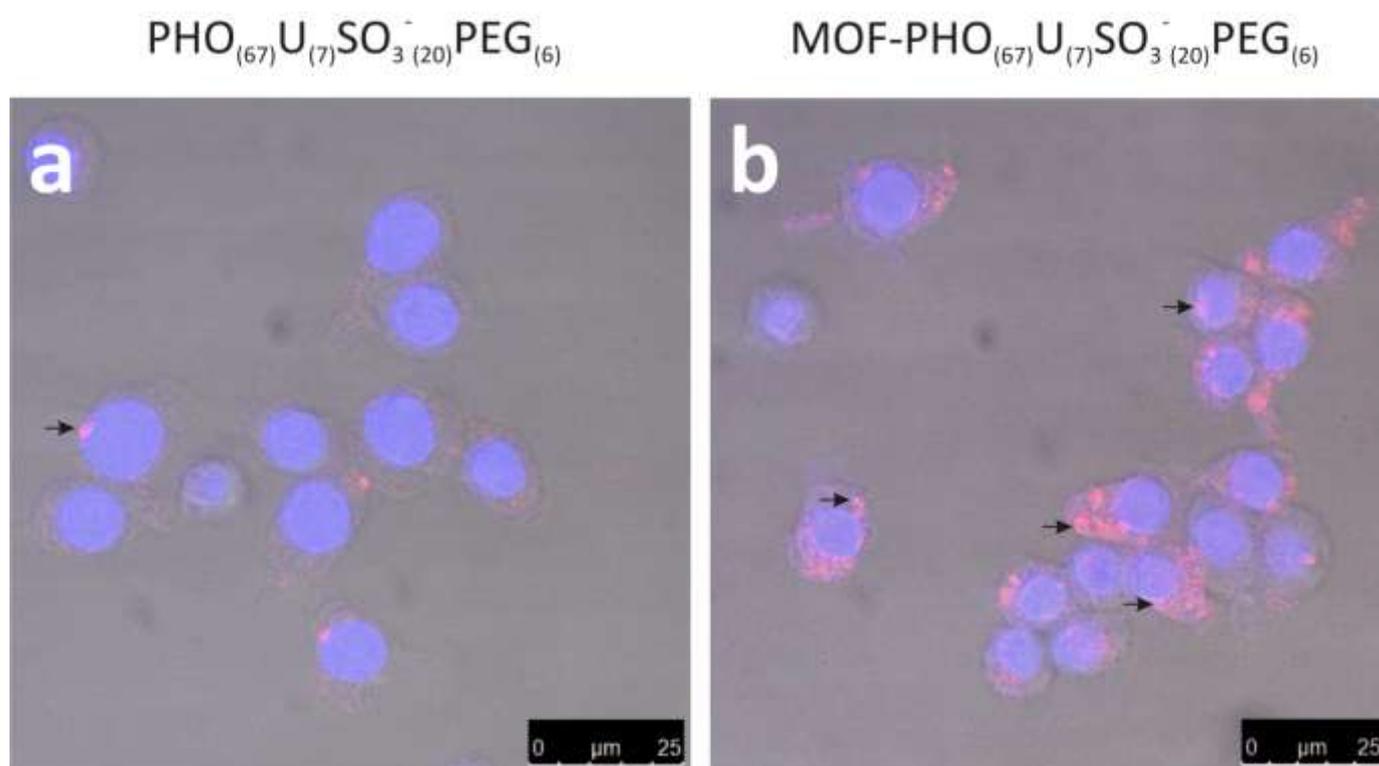


**Figure 53.** Images de microscopie confocale d'un macrophage murin J774.A1 après 3 h d'incubation, sans traitement (a) et en présence de 100 µg/mL de nanoparticules de type MOF MIL-100.

*Flèches noires : nanoparticules de type MOF.*

La **Figure 53** montre des macrophages murins J774.A1 après 3 h d'incubation dans le milieu de contrôle non traité (a) et au contact de 100 µg/mL de nanoparticules de type MOF MIL-100(Fe) (b), visualisés par microscopie en lumière réfléchie à l'aide d'une source lumineuse laser. Les noyaux cellulaires préalablement marqués au fluorophore DAPI apparaissent de couleur verte en fluorescence. Alors qu'aucune masse particulière n'est visible au sein des macrophages non traités, des objets arrondis, sombres et relativement nombreux correspondant probablement à des nanoparticules de type MOF agrégées sont observés dans l'ensemble du compartiment cytosolique, de la même manière qu'observée

par Bellido *et al.*, Agostoni, Horcajada, *et al.*, Tamames-Tabar *et al.* (2013) et Agostoni *et al.* (2015). Ces images confirment d'une part la viabilité des macrophages, ainsi que l'internalisation rapide des nanoparticules de type MOF par les cellules phagocytaires, en moins de 3 h.



**Figure 54.** Images de microscopie confocale de macrophages murins J774.A1 après 3 h d'incubation au contact de 200 µg/mL de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  imprégnés de rhodamine b (a) ou de 100µg/mL de nanoparticules de type  $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  (b).

*Flèches noires : agrégats de PHA ou de nanoparticules hybrides MOF-PHA.*

La **Figure 54** présente des macrophages murins ayant été incubés pendant 3 h au contact de 200 µg/mL de copolymères de  $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  (a) ou de 100 µg/mL de nanoparticules hybrides  $\text{MOF-PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  (b). Le PHA fonctionnalisé a été préalablement imprégné dans une solution de fluorophore rhodamine b. La rhodamine b en excès, enchevêtrée au sein des copolymères, a été éliminée par quatre dialyses successives, nombre de cycles permettant l'obtention d'une eau de filtrat incolore. Les noyaux cellulaires apparaissent cette fois en bleu, tandis que des objets, visibles après 3 h d'incubation en présence de copolymères de PHA ou de nanoparticules hybrides, fluorescent en rose. A

chaque fois, la matière fluorescente rose relative à la présence de rhodamine b, n'est observée que dans l'espace cellulaire. Ces composés fluorescents sont vraisemblablement internalisés à l'intérieur des macrophages, ou sont alors étroitement liés à la paroi des cellules, puisque les quatre rinçages réalisés lors de l'étape de fixation des macrophages avant observation microscopique ont sans nul doute éliminé toute matière libre présente dans le milieu de culture.

Ces observations semblent concorder avec un processus d'internalisation des PHA fonctionnalisés libres ou des nanoparticules hybrides MOF-PHA au sein des cellules de type macrophages. Dans le cadre de cette expérience, la rhodamine b n'a pas été chimiquement greffée aux PHA, c'est-à-dire liée de manière covalente. En effet, même si de précédentes études ont mis en évidence l'adsorption spontanée et durable de molécules de rhodamine b sur des matrices hautement hydrophiles de PEG (PEG-PLA, Essa *et al.*, 2011, ou PEG-PMMA, Gavrilenko *et al.*, 2015), il est à ce jour impossible d'affirmer que ces signaux fluorescents proviennent exclusivement des PHA imprégnés de rhodamine b, et non de simples phénomènes de diffusion de rhodamine b au travers des parois cellulaires des macrophages.

En conclusion, les observations de microscopie confocale menées sur les macrophages incubés en présence de 200 µg/mL de PHA fonctionnalisés ou de 100 µg/mL de systèmes hybrides poreux MOF-PHA ne montrent pas de processus de lyse cellulaire au bout de 3 h d'incubation, et confirment ainsi la non-toxicité de ces composés.

# CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES



Les travaux relatifs à l'axe microbiologie de cette thèse consistaient à **détecter**, par criblage moléculaire PCR, les bactéries issues de la collection Ifremer-LM2E potentiellement capables de synthétiser des copolymères de P(3HB4HB), puis à **produire** ces PHA en conditions de laboratoire, avec des rendements et ratios de 4HB les plus élevés possible. Enfin, il s'agissait de réaliser l'analyse taxonomique des souches productrices de PHA, afin d'**explorer** la biodiversité microbienne associée aux environnements marins profonds.

La méthode de criblage moléculaire par technique PCR mise au point durant ces travaux a permis de sélectionner **89** souches porteuses des gènes codant la PHA synthase de type I et la 4-hydroxybutyrate-CoenzymeA-transférase, et donc potentiellement productrices de copolymères de P(3HB4HB). Bien que la méthode de criblage PCR n'ait pu être validée à ce jour, plus de **80%** des souches criblées positives pour les gènes *phaC* et *4HBCoAt* ont produit un polymère de type PHA à courtes chaînes, et **32** d'entre elles ont synthétisé des copolymères de P(3HB4HB), suivant des conditions de culture standardisées.

Une perspective intéressante à ce travail serait de développer une technique de criblage moléculaire par PCR, adaptée à la détection de bactéries productrices de PHA à courtes chaînes tant marines que terrestres. Tout d'abord, il s'agirait d'accéder au gène d'intérêt *phaC* chez un maximum de genres et espèces bactériennes différentes. Cependant, comme il n'existe à ce jour que très peu de séquences annotées relatives au gène *phaC* dans la base de données NCBI, il faudrait rechercher le gène d'intérêt parmi les génomes complets d'ores et déjà disponibles, par des techniques de bioinformatique. Dans le cas où tous les genres et espèces bactériennes, du moins explorés dans le cadre de cette étude, n'étaient pas consignés dans la plateforme, il faudrait également séquencer l'intégralité des génomes des individus dont la taxonomie est manquante, avant de ne repérer le gène cible par ces mêmes procédés informatiques. Une fois ce travail terminé, nécessaire à l'élaboration d'une banque de données représentative, la comparaison des différentes séquences du gène *phaC* pourrait être menée, puis celles-ci seraient classées selon leurs ressemblances nucléotidiques. Des sous-groupes de gènes similaires seraient créés, de façon à repérer deux ou plusieurs régions conservées au sein des séquences nucléotidiques, non dégénérées et longues d'au moins 25 nucléotides chacune. Dans ces conditions précises, des amorces PCR spécifiques pourraient être dessinées, permettant l'amplification génique de produits PCR découlant uniquement du gène cible, et non plus de portions nucléotidiques

aspécifiques. Toutefois, au vu de la variabilité importante du gène *phaC* de type I, il faudrait probablement développer plusieurs dizaines de couples d'amorces différents pour espérer correspondre de manière significative à chaque genre bactérien, voire à chaque espèce. L'objectif d'une méthode moléculaire rapide et peu onéreuse serait alors compromis, mais ce large panel d'amorces PCR permettrait de déterminer de manière certaine les potentialités de production de PHA de chaque individu. Par ailleurs, la mise au point d'une stratégie de criblage du gène *4HBCoAt* serait identique, multipliant les efforts pour aboutir à une méthode fiable de criblage de bactéries productrices de P(3HB4HB).

Concernant l'objectif de production de copolymères de P(3HB4HB) aux rendements et ratios d'unités 4HB les plus élevés possible, celui-ci a été atteint puisqu'un nombre important d'échantillons de P(3HB4HB) a été produit au cours des différentes expériences, avec un rendement maximal de **570 mg de P(3HB4HB) purifiés par gramme de masse cellulaire sèche** (souche ST350), et un taux maximal de **12% d'unités 4HB** (AT1233). En parallèle, il a été observé que le temps nécessaire à l'accumulation de PHA varie significativement selon les genres bactériens considérés. En effet, alors que les isolats appartenant au genre *Halomonas* ont nécessité une période d'accumulation supérieure ou égale à 70 h pour atteindre un rendement optimal de PHA, les espèces affiliées au genre *Vibrio* ont synthétisé des polymères en quantités maximales en moins de 24 h, avant de ne probablement reconsumer ceux-ci pour subvenir à leurs propres besoins énergétiques. Les autres espèces ont quant à elles produit un maximum de polyesters d'intérêt au bout d'environ 48 h de fermentation bactérienne.

Toutefois, les conditions de culture standardisée, en particulier la carence en éléments minéraux, ont pu restreindre les capacités de production de PHA, que ce soit en erlenmeyers ou en bioréacteurs. Ainsi, il faudrait songer à élaborer une formule normalisée composée de divers ions métalliques et nutritifs, nécessaire au bon fonctionnement métabolique de toutes souches marines. Celle-ci serait alors supplémentée aux milieux de culture destinés à la fermentation cellulaire, y compris dans le cadre de protocoles standardisés. D'autre part, il serait intéressant de poursuivre les expériences de production optimisée de PHA sur les souches les plus prometteuses en termes de rendements et de ratios de 4HB, à l'image des isolats AT1214 ou AT1233. Aussi et de manière plus générale,

d'autres sources carbonées pourraient être employées sur l'intégralité des souches (autres glucides, 1,4-butanediol,  $\gamma$ -butyrolactone).

Enfin et s'agissant de l'objectif exploration de la diversité bactérienne associée aux environnements marins profonds, la caractérisation taxonomique et phylogénétique des souches bactériennes Ifremer-LM2E cultivées dans le cadre de ces travaux a permis d'établir la première étude démontrant les capacités de production de copolymères de P(3HB4HB) à partir de bactéries natives, issues de monts hydrothermaux des océans Atlantique et Pacifique. Ces travaux mettent également en évidence la diversité des espèces capables de produire des PHA à courtes chaînes en conditions de laboratoire, appartenant à **sept** genres bactériens différents, dont les genres *Alteromonas*, *Rheiheimera* et *Ruegeria* pour lesquels la capacité à synthétiser des PHA est décrite pour la première fois. Ces données en lien avec la distribution géographique des isolats enrichissent nos connaissances sur l'écologie des communautés microbiennes colonisant les écosystèmes marins profonds, et mettent en lumière le rôle fondamental des PHA dans les mécanismes de survie et de résistance aux stress, pour les micro-organismes exposés à des conditions environnementales extrêmes.

Par ailleurs, il serait pertinent de poursuivre les analyses taxonomiques en ce sens, afin d'appréhender les relations phylogénétiques existant entre l'intégralité des 344 souches bactériennes mésophiles aérobies de la collection Ifremer-LM2E. Pour aller plus loin, il serait également intéressant de considérer la totalité des 1400 isolats de cette collection microbienne atypique et unique, de façon à relier et cerner les potentiels liens métaboliques, voire symbiotiques, entre ces différents micro-organismes originaires d'écosystèmes présumés être à l'origine de la vie sur Terre.

La partie chimie de cette thèse visait à fonctionnaliser des polymères de PHA pour générer un matériau hydrosoluble d'intérêt biomédical. Dans un premier temps, la modification chimique de copolymères de P(3HB4HB) a été entreprise, mais rapidement écartée en raison de faibles potentiels d'hydrosolubilité et de rendements engendrés. Toutefois, le développement de copolymères de P(3HB4HB) hydrosolubles, devrait être prochainement entrepris, d'autant que cette thématique représente un axe de recherche pertinent et nouveau. En effet, aujourd'hui trop peu de techniques de fonctionnalisation de PHA à courtes chaînes sont décrites dans la littérature.

Dans ce contexte, un PHA à moyennes chaînes insaturées, le PHOU, plus aisément fonctionnalisable, a été sélectionné pour le greffage par réaction thiol-ène photoactivée de groupements sulfonates, permettant l'adsorption du polymère à la surface de nanoparticules de type MOF MIL-100(Fe), et de PEG à caractère furtif, c'est-à-dire ayant une forte capacité à échapper aux cellules phagocytaires du système immunitaire. Deux copolymères hydrosolubles ont été synthétisés ( $\text{PHO}_{(67)}\text{U}_{(7)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(6)}$  et  $\text{PHO}_{(67)}\text{SO}_3^-(20)\text{PEG}_{(13)}$ ), avec des rendements supérieurs à 90%.

Ces PHA fonctionnalisés ont ensuite été imprégnés à la surface de nanoparticules poreuses de type MOF MIL-100(Fe), pour la conception de nouveaux systèmes hybrides poreux MOF-PHA pour la libération de principes actifs. Ces nanoparticules sont stables pendant plusieurs jours dans l'eau, et plus de 6 h en milieu salin tamponné, période compatible avec l'application thérapeutique envisagée. Deux techniques de microscopie électronique couplée à la spectroscopie dispersive des rayons X (SEM et STEM-EDX) ont été employées, simultanément et pour la première fois, afin de caractériser ces nanoparticules hybrides MOF-PHA. La SEM et le STEM-EDX sont des procédés quantitatifs efficaces et rapides, ayant mis en évidence la présence de molécules de soufre, marqueurs des PHA fonctionnalisés à la surface des MOF, confirmant ainsi le recouvrement des MOF par les PHA hydrosolubles.

Pour une utilisation de ces nanoparticules dans le domaine biomédical, la cytotoxicité des copolymères et des nanoparticules hybrides MOF-PHA ainsi que leur influence sur la prolifération de macrophages murins J774.A1 ont été évaluées à l'aide de kits commerciaux (LDH et RealTime Glo). Les résultats obtenus montrent une absence de toxicité des copolymères de PHA fonctionnalisés jusqu'à une concentration au moins égale à 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . D'autre part, ces expériences préconisent l'usage de nanoparticules hybrides MOF-PHA à des valeurs relativement élevées, supérieures à 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , et indiquent une concentration inhibitrice médiane de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Ces tests de biologie cellulaire révèlent également une meilleure biocompatibilité des nanoparticules hybrides par rapport aux nanoparticules de type MOF natifs. Néanmoins, l'activation voire l'intensité des potentiels processus de réaction inflammatoire devront être établies, par exemple par dosage de molécules marqueurs de l'inflammation phagocytaire ou cytokines de types TNF- $\alpha$  ou IL-1, IL-6, IL-8.

Enfin, le comportement des macrophages J774.A1 au contact des nanoparticules hybrides et copolymères fonctionnalisés a été observé par microscopie confocale. Cette étude préliminaire semble confirmer l'absence de toxicité des nanoparticules de type MOF natifs ou enrobés de PHA fonctionnalisés incubées à une concentration de 100 µg/mL, puisqu'aucun processus de lyse cellulaire n'a été observé. Cependant, l'efficacité de la méthode de marquage des nanoparticules par la rhodamine b, de même que les propriétés de furtivité des copolymères dues à la présence de PEG, n'ont pu être validées avec certitude. Ainsi, il serait intéressant de développer un nouveau PHA fonctionnalisé greffé de rhodamine b, permettant de suivre de manière précise l'internalisation des nanoparticules au sein des cellules, et d'exclure tout phénomène de diffusion des fluorophores libres au travers des parois cellulaires. D'autre part et dans l'optique de prouver l'efficacité des propriétés de furtivité imputées au PEG, il faudrait envisager la synthèse de copolymères de PHA dépourvus de PEG, afin de comparer les temps d'ingestion des différents copolymères par les cellules phagocytaires, et de confirmer ou non le caractère furtif de ces nouveaux systèmes hybrides poreux MOF-PHA, développés pour la délivrance de principes actifs.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux a permis le développement de nouvelles techniques et l'obtention de résultats prometteurs en biologie moléculaire, production de PHA, exploration de la biodiversité des écosystèmes marins profonds, ou encore synthèse de PHA hydrosolubles comme de systèmes hybrides poreux MOF-PHA. Cette étude de thèse s'est positionnée à l'interface de plusieurs axes de recherche, et il semble indispensable de poursuivre les études fondamentales et appliquées relatives aux potentiels des Poly(HydroxyAlcanoates) bactériens, par des stratégies multidisciplinaires et complémentaires, impliquant des connaissances et compétences tant dans les domaines de la biologie que de la chimie.



# REFERENCES

# BIBLIOGRAPHIQUES



- Adam, P. a. J., Rähkä, N., Rähälä, E.-L., and Kekomäki, M. (1975) Oxidation of glucose and D- $\beta$ -OH-butyrate by the early human fetal brain. *Acta Paediatrica* **64**: 17–24.
- Aderem, A. and Underhill, D.M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology* **17**: 593–623.
- Agostoni, V., Chalati, T., Horcajada, P., Willaime, H., Anand, R., Semiramoth, N., et al. (2013) Towards an improved anti-HIV activity of NRTI via metal-organic frameworks nanoparticles. *Advanced Healthcare Materials* **2**: 1630–1637.
- Agostoni, V., Horcajada, P., Noiray, M., Malanga, M., Aykaç, A., Jicsinszky, L., et al. (2015) A “green” strategy to construct non-covalent, stable and bioactive coatings on porous MOF nanoparticles. *Scientific Reports* **5**: 1–7.
- Agostoni, V., Horcajada, P., Rodriguez-Ruiz, V., Willaime, H., Couvreur, P., Serre, C., and Gref, R. (2013) ‘Green’ fluorine-free mesoporous iron(III) trimesate nanoparticles for drug delivery. *Green Materials* **1**: 209–217.
- Alcantar, N.A., Aydil, E.S., and Israelachvili, J.N. (2000) Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Journal of biomedical materials research* **51**: 343–351.
- Ali, I. and Jamil, N. (2016) Polyhydroxyalkanoates: current applications in the medical field. *Front. Biol.* **11**: 19–27.
- Amass, W., Amass, A., and Tighe, B. (1998) A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer International* **47**: 89–144.
- Amoozgar, Z. and Yeo, Y. (2012) Recent advances in stealth coating of nanoparticle drug delivery systems. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **4**: 219–233.
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews* **54**: 450–472.
- Armstrong, S.J., Wiberg, M., Terenghi, G., and Kingham, P.J. (2007) ECM molecules mediate both Schwann cell proliferation and activation to enhance neurite outgrowth. *Tissue Engineering* **13**: 2863–2870.
- Arora, S. and Menchine, M. (2012) The role of point-of-care  $\beta$ -hydroxybutyrate testing in the diagnosis of diabetic ketoacidosis: a review. *Hospital Practice* **40**: 73–78.
- Ashby, R.D., Solaiman, D.K.Y., and Foglia, T.A. (2005) Synthesis of short-/medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) blends by mixed culture fermentation of glycerol. *Biomacromolecules* **6**: 2106–2112.
- Avella, M., Martuscelli, E., and Raimo, M. (2000) Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. *Journal of Materials Science* **35**: 523–545.
- Avérous, L. (2004) Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *Journal of Macromolecular Science, Part C* **44**: 231–274.
- Aykaç, A., Noiray, M., Malanga, M., Agostoni, V., Casas-Solvas, J.M., Fenyvesi, É., et al. (2017) A non-covalent “click chemistry” strategy to efficiently coat highly porous MOF nanoparticles with a stable polymeric shell. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1861**: 1606–1616.
- Ayub, N.D., Tribelli, P.M., and López, N.I. (2009) Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles* **13**: 59–66.

- Baati, T., Njim, L., Neffati, F., Kerkeni, A., Bouttemi, M., Gref, R., et al. (2013) In depth analysis of the in vivo toxicity of nanoparticles of porous iron(III) metal–organic frameworks. *Chem. Sci.* **4**: 1597–1607.
- Babinot, J., Guigner, J.-M., Renard, E., and Langlois, V. (2012) Poly(3-hydroxyalkanoate)-derived amphiphilic graft copolymers for the design of polymersomes. *Chemical Communications* **48**: 5364.
- Babinot, J., Renard, E., and Langlois, V. (2011) Controlled synthesis of well defined poly(3-hydroxyalkanoate)s-based amphiphilic diblock copolymers using click chemistry. *Macromolecular Chemistry and Physics* **212**: 278–285.
- Babinot, J., Renard, E., and Langlois, V. (2010) Preparation of *clickable* poly(3-hydroxyalkanoate) (PHA): application to poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymers synthesis. *Macromolecular Rapid Communications* **31**: 619–624.
- Babinot, J., Renard, E., Le Droumaguet, B., Guigner, J.-M., Mura, S., Nicolas, J., et al. (2013) Facile synthesis of multicompartement micelles based on biocompatible poly(3-hydroxyalkanoate). *Macromolecular Rapid Communications* **34**: 362–368.
- Bachmann, R.T., Johnson, A.C., and Edyvean, R.G.J. (2014) Biotechnology in the petroleum industry: an overview. *International Biodeterioration & Biodegradation* **86**: 225–237.
- Baharoglu, Z. and Mazel, D. (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 1126–1145.
- Baldi, F., Ivošević, N., Minacci, A., Pepi, M., Fani, R., Svetličić, V., and Žutić, V. (1999) Adhesion of *Acinetobacter venetianus* to diesel fuel droplets studied with *in situ* electrochemical and molecular probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2041–2048.
- Baran, E.T., Özer, N., and Hasirci, V. (2002) Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an *in vitro* study. *Journal of Microencapsulation* **19**: 363–376.
- Bear, M.-M., Leboucher-Durand, M.-A., Langlois, V., Lenz, R.W., Goodwin, S., and Guérin, P. (1997) Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxy groups in the side chains. *Reactive and Functional Polymers* **34**: 65–77.
- Bear, M.-M., Renard, E., Randriamahefa, S., Langlois, V., and Guérin, P. (2001) Preparation of a bacterial polyester with carboxy groups in side chains. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry* **4**: 289–293.
- Bellido, E., Hidalgo, T., Lozano, M.V., Guillevic, M., Simón-Vázquez, R., Santander-Ortega, M.J., et al. Heparin-engineered mesoporous iron metal-organic framework nanoparticles: toward stealth drug nanocarriers. *Advanced Healthcare Materials* **4**: 1246–1257.
- Bettencourt, R., Dando, P., Collins, P., Costa, V., Allam, B., and Serrão Santos, R. (2009) Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **152**: 278–289.
- Bloa, S.L., Durand, L., Gauchard, V.C., Bars, J.L., Taupin, L., Marteau, C., et al. (2017) Highlighting of quorum sensing *lux* genes and their expression in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* ectosymbiotic community. Possible use as biogeographic markers. *PLOS ONE* **12**: 1-19.
- Bocca, C., Caputo, O., Cavalli, R., Gabriel, L., Miglietta, A., and Gasco, M.R. (1998) Phagocytic uptake of fluorescent stealth and non-stealth solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics* **175**: 185–193.

- Boesel, L.F., Meur, S.L., Thöny-Meyer, L., and Ren, Q. (2014) The effect of molecular weight on the material properties of biosynthesized poly(4-hydroxybutyrate). *International Journal of Biological Macromolecules* **71**: 124–130.
- Bordes, P., Pollet, E., and Avérous, L. (2009) Nano-biocomposites: Biodegradable polyester/nanoclay systems. *Progress in Polymer Science* **34**: 125–155.
- Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J.O. (2012) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **64**: 206–212.
- Braunegg, G., Sonnleitner, B., and Lafferty, R.M. (1978) A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 29–37.
- Brigham, C.J. and Sinskey, A.J. (2012) Applications of polyhydroxyalkanoates in the medical industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* **1**: 53-60.
- Butt, F.I., Muhammad, N., Hamid, A., Moniruzzaman, M., and Sharif, F. (2018) Recent progress in the utilization of biosynthesized polyhydroxyalkanoates for biomedical applications – Review. *International Journal of Biological Macromolecules* **120**: 1294–1305.
- Cai, S., Cai, L., Zhao, D., Liu, G., Han, J., Zhou, J., and Xiang, H. (2014) A novel DNA-binding protein, PhaR, plays a central role in the regulation of polyhydroxyalkanoate accumulation and granule formation in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 373-385.
- Cai, W., Gao, H., Chu, C., Wang, X., Wang, J., Zhang, P., et al. (2017) Engineering phototheranostic nanoscale metal–organic frameworks for multimodal imaging-guided cancer therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**: 2040–2051.
- Cantor, C.R. (2000) Biotechnology in the 21st century. *Trends in Biotechnology* **18**: 6–7.
- Chalati, T., Horcajada, P., Couvreur, P., Serre, C., Ben Yahia, M., Maurin, G., and Gref, R. (2011) Porous metal organic framework nanoparticles to address the challenges related to busulfan encapsulation. *Nanomedicine* **6**: 1683–1695.
- Chalkiadakis, E., Dufourcq, R., Schmitt, S., Brandily, C., Kervarec, N., Coatanea, D., et al. (2013) Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp. nov., from New Caledonia. *Journal of Applied Microbiology* **114**: 1702–1712.
- Chanprateep, S. (2010) Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **110**: 621–632.
- Chen, C., Yu, C.H., Cheng, Y.C., Yu, P.H.F., and Cheung, M.K. (2006) Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials* **27**: 4804–4814.
- Chen, G.-Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* **38**: 2434-2446.
- Chen, G.-Q. and Wu, Q. (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* **26**: 6565–6578.
- Chen, G.-Q. and Zhang, J. (2018) Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **46**: 1–18.
- Chen, T.H.H. and Murata, N. (2002) Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 250–257.

- Chen, W. and Tong, Y.W. (2012) PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon–dendrite polarization. *Acta Biomaterialia* **8**: 540–548.
- Chen, Y., Tsai, Y.-H., Chou, I.-N., Tseng, S.-H., and Wu, H.-S. (2014) Application of biodegradable polyhydroxyalkanoates as surgical films for ventral hernia repair in mice. *International Journal of Polymer Science* **14**: 1-11.
- Cheng, Y., Deng, S., Chen, P., and Ruan, R. (2009) Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Front. Chem. China* **4**: 259–264.
- Chidambarampadmavathy, K., Karthikeyan, O.P., and Heimann, K. (2017) Sustainable bioplastic production through landfill methane recycling. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **71**: 555–562.
- Chien, C., Chen, C., Choi, M., Kung, S., and Wei, Y. (2007) Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology* **132**: 259–263.
- Choi, M.H., Yoon, S.C., and Lenz, R.W. (1999) Production of poly (3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly (4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Applied and environmental microbiology* **65**: 1570–1577.
- Chung, C.W., Kim, H.W., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H. (2003) Poly(ethylene glycol)-grafted poly(3-hydroxyundecenoate) networks for enhanced blood compatibility. *International Journal of Biological Macromolecules* **32**: 17–22.
- Ciesielski, S., Cydzik-Kwiatkowska, A., Pokoj, T., and Klimiuk, E. (2006) Molecular detection and diversity of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates-producing bacteria enriched from activated sludge. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 190–199.
- Cool, S.M., Kenny, B., Wu, A., Nurcombe, V., Trau, M., Cassady, A.I., and Grøndahl, L. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration: *In vitro* performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **82A**: 599–610.
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., Herzen, R.P. von, Ballard, R.D., et al. (1979) Submarine thermal springs on the Galápagos Rift. *Science* **203**: 1073–1083.
- Corliss, J.B., Lyle, M., Dymond, J., and Crane, K. (1978) The chemistry of hydrothermal mounds near the Galapagos Rift. *Earth and Planetary Science Letters* **40**: 12–24.
- Crauste, C., Périgaud, C., and Peyrottes, S. (2009) Insights into the soluble PEG-supported synthesis of cytosine-containing nucleoside 5'-mono-, di-, and triphosphates. *J. Org. Chem.* **74**: 9165–9172.
- de la Cruz, F. and Davies, J. (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* **8**: 128–133.
- Cunliffe, M. (2012) Physiological and metabolic effects of carbon monoxide oxidation in the model marine bacterioplankton *Ruegeria pomeroyi* DSS-3. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 738-740.
- Dawes, E.A. and Senior, P.J. (1973) The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*. 135–266.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., and Bossier, P. (2011) Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology* **14**: 251–258.
- Dellacherie, É., Gref, R., and Quellec, P. (2001) Les nanosphères" furtives" comme nouvelles formes galéniques injectables: espoirs et réalités. **17** : 619-626.

- DeLong, E.F. (2005) Microbial community genomics in the ocean. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 459–469.
- Deng, Y., Zhao, K., Zhang, X., Hu, P., and Chen, G.-Q. (2002) Study on the three-dimensional proliferation of rabbit articular cartilage-derived chondrocytes on polyhydroxyalkanoate scaffolds. *Biomaterials* **23**: 4049–4056.
- Denmark, L.N. (1993) The investigation of beta-hydroxybutyrate as a marker for sudden death due to hypoglycemia in alcoholics. *Forensic Science International* **62**: 225–232.
- Dincă, M. and Long, J.R. (2008) Hydrogen storage in microporous metal–organic frameworks with exposed metal sites. *Angewandte Chemie International Edition* **47**: 6766–6779.
- Doi, Y., Kanetsawa, Y., Kunioka, M., and Saito, T. (1990) Biodegradation of microbial copolyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **23**: 26–31.
- Doi, Y., Kitamura, S., and Abe, H. (1995) Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* **28**: 4822–4828.
- Domenek, S., Langlois, V., and Renard, E. (2007) Bacterial polyesters grafted with poly(ethylene glycol): Behaviour in aqueous media. *Polymer Degradation and Stability* **92**: 1384–1392.
- Doyle, C., Tanner, E.T., and Bonfield, W. (1991) *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyhydroxybutyrate and of polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite. *Biomaterials* **12**: 841–847.
- Drouillard, S., Jeacomine, I., Buon, L., Boisset, C., Courtois, A., Thollas, B., et al. (2018) Structure of the exopolysaccharide secreted by a marine strain *Vibrio alginolyticus*. *Marine Drugs* **16**: 164.
- Dubilier, N., Bergin, C., and Lott, C. (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 725–740.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- Eke, G., Kuzmina, A.M., Goreva, A.V., Shishatskaya, E.I., Hasirci, N., and Hasirci, V. (2014) *In vitro* and transdermal penetration of PHBV micro/nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **25**: 1471–1481.
- Elvers, D., Song, C.H., Steinbüchel, A., and Leker, J. (2016) Technology trends in biodegradable polymers: evidence from patent analysis. *Polymer Reviews* **56**: 584–606.
- Eroğlu, M.S., Hazer, B., Ozturk, T., and Caykara, T. (2005) Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. *Journal of Applied Polymer Science* **97**: 2132–2139.
- Errico, C., Bartoli, C., Chiellini, F., and Chiellini, E. (2009) Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2009**: 1–10.
- Essa, S., Rabanel, J.M., and Hildgen, P. (2011) Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): effect of poly(ethylene glycol) grafting density. *Int J Pharm* **411**: 178–187.
- Férey, G., Mellot-Draznieks, C., Serre, C., and Millange, F. (2005) Crystallized frameworks with giant pores: are there limits to the possible? *Acc. Chem. Res.* **38**: 217–225.
- Filippousi, M., Turner, S., Leus, K., Siafaka, P.I., Tseligka, E.D., Vandichel, M., et al. (2016) Biocompatible Zr-based nanoscale MOFs coated with modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) as anticancer drug carriers. *International Journal of Pharmaceutics* **509**: 208–218.

- Fondi, M., Rizzi, E., Emiliani, G., Orlandini, V., Berna, L., Papaleo, M.C., et al. (2013) The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3. *Research in Microbiology* **164**: 439–449.
- Francheteau, J., Needham, H.D., Choukroune, P., Juteau, T., Séguret, M., Ballard, R.D., et al. (1981) First manned submersible dives on the East Pacific Rise at 21°N (project RITA): General results. *Mar Geophys Res* **4**: 345–379.
- Francheteau, J., Needham, H.D., Choukroune, P., Juteau, T., Séguret, M., Ballard, R.D., et al. (1979) Massive deep-sea sulphide ore deposits discovered on the East Pacific Rise. *Nature* **277**: 523–528.
- Fritzsche, K., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1990) An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group. *Die Makromolekulare Chemie* **191**: 1957–1965.
- Fujimaki, T. (1998) Processability and properties of aliphatic polyesters, 'BIONOLLE', synthesized by polycondensation reaction. *Polymer Degradation and Stability* **59**: 209–214.
- Fujiwara, N. and Kobayashi, K. (2005) Macrophages in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* **4**: 281–286.
- Galego, N., Rozsa, C., Sánchez, R., Fung, J., Analía Vázquez, and Santo Tomás, J. (2000) Characterization and application of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. *Polymer Testing* **19**: 485–492.
- Galleguillos, P.A., Grail, B.M., Hallberg, K.B., Demergasso, C.S., and Johnson, D.B. (2018) Identification of trehalose as a compatible solute in different species of acidophilic bacteria. *J Microbiol.* **56**: 727–733.
- Galtier, N., Gouy, M., and Gautier, C. (1996) SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* **12**: 543–548.
- García Márquez, A., Demessence, A., Platero-Prats, A.E., Heurtaux, D., Horcajada, P., Serre, C., et al. (2012) Green microwave synthesis of MIL-100(Al, Cr, Fe) nanoparticles for thin-film elaboration. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**: 5165–5174.
- García-Martínez, J., Acinas, S.G., Massana, R., and Rodríguez-Valera, F. (2002) Prevalence and microdiversity of *Alteromonas macleodii*-like microorganisms in different oceanic regions. *Environmental Microbiology* **4**: 42–50.
- Gavrilenko, M.A., Gazieva, E.A., Gavrilenko, N.A., and Kirsanova, I.V. (2015) Effect of polyethylene glycol immobilized into a polymethacrylate matrix on the sorption of rhodamine. *Procedia Chemistry* **15**: 21–26.
- Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005) Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances* **23**: 471–499.
- Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Ebrahiminezhad, A., Zarrini, G., Kazemi, A., Mousavi-Khorshidi, S., et al. (2010) Halotolerant amylase production by a novel bacterial strain *Rheinheimera aquimaris*. *Research Journal of Microbiology* **5**: 144–149.
- Giménez-Marqués, M., Bellido, E., Berthelot, T., Simón-Yarza, T., Hidalgo, T., Simón-Vázquez, R., et al. (2018) GraftFast surface engineering to improve MOF nanoparticles furtiveness. *Small* **18011900**: 1–11.
- Goh, L.-K., Purama, R.K., and Sudesh, K. (2014) Enhancement of stress tolerance in the polyhydroxyalkanoate producers without mobilization of the accumulated granules. *Appl Biochem Biotechnol* **172**: 1585–1598.
- Grage, K., Jahns, A.C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I.A., Atwood, J.A., and Rehm, B.H.A. (2009) Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and

- potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules* **10**: 660–669.
- Grall, R., Hidalgo, T., Delic, J., Garcia-Marquez, A., Chevillard, S., and Horcajada, P. (2015) *In vitro* biocompatibility of mesoporous metal (III; Fe, Al, Cr) trimesate MOF nanocarriers. *J. Mater. Chem. B* **3**: 8279–8292.
- Green Tringe, S., von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., et al. (2005) Comparative metagenomics of microbial communities. *Science* **308**: 554–557.
- Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., et al. (2000) ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **18**: 301–313.
- Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., and Langer, R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **263**: 1600–1603.
- Gross, R.A., DeMello, C., Lenz, R.W., Brandl, H., and Fuller, R.C. (1989) The biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **22**: 1106–1115.
- Guezennec, J., Rocchiccioli, F., Maccaron-Gomez, B., Khelifa, N., Dussauze, J., and Rimbault, A. (1998) Occurrence of 3-hydroxyalkanoic acids in sediments from the Guaymas basin (Gulf of California). *FEMS microbiology ecology* **26**: 335–344.
- Gürsel, İ., Korkusuz, F., Türesin, F., Gürdal Alaeddinoğlu, N., and Hasırcı, V. (2000) *In vivo* application of biodegradable controlled antibiotic release systems for the treatment of implant-related osteomyelitis. *Biomaterials* **22**: 73–80.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95–98.
- Han, C.Z., Juncadella, I.J., Kinchen, J.M., Buckley, M.W., Klibanov, A.L., Dryden, K., et al. (2016) Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation. *Nature* **539**: 570–574.
- Hasan, N.A., Grim, C.J., Lipp, E.K., Rivera, I.N.G., Chun, J., Haley, B.J., et al. (2015) Deep-sea hydrothermal vent bacteria related to human pathogenic *Vibrio* species. *PNAS* **201503928**: 1-7.
- Hauschild, P., Röttig, A., Madkour, M.H., Al-Ansari, A.M., Almakishah, N.H., and Steinbüchel, A. (2017) Lipid accumulation in prokaryotic microorganisms from arid habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* **101**: 2203–2216.
- Hazari, A., Wiberg, M., Johansson-Rudén, G., Green, C., and Terenghi, G. (1999) A resorbable nerve conduit as an alternative to nerve autograft in nerve gap repair. *British Journal of Plastic Surgery* **52**: 653–657.
- Hazer, B., Hazer, D.B., and Çoban, B. (2010) Synthesis of microbial elastomers based on soybean oil. Autoxidation kinetics, thermal and mechanical properties. *J Polym Res* **17**: 567–577.
- Hazer, B. and Steinbüchel, A. (2007) Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 1–12.
- Hazer, D.B., Kılıçay, E., and Hazer, B. (2012) Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review. *Materials Science and Engineering: C* **32**: 637–647.

- He, C., Liu, D., and Lin, W. (2015) Nanomedicine applications of hybrid nanomaterials built from metal–ligand coordination bonds: nanoscale metal–organic frameworks and nanoscale coordination polymers. *Chemical Reviews* **115**: 11079–11108.
- He, X., Li, L., Su, H., Zhou, D., Song, H., Wang, L., and Jiang, X. (2015) Poly(ethylene glycol)-block-poly( $\epsilon$ -caprolactone)-and phospholipid-based stealth nanoparticles with enhanced therapeutic efficacy on murine breast cancer by improved intracellular drug delivery. *Int J Nanomedicine* **10**: 1791–1804.
- Hein, S., Söhling, B., Gottschalk, G., and Steinbüchel, A. (1997) Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **153**: 411–418.
- Hernandez-Izquierdo, V.M. and Krochta, J.M. (2008) Thermoplastic processing of proteins for film formation—a review. *Journal of Food Science* **73**: 30–39.
- Hidalgo, T., Giménez-Marqués, M., Bellido, E., Avila, J., Asensio, M.C., Salles, F., et al. (2017) Chitosan-coated mesoporous MIL-100(Fe) nanoparticles as improved bio-compatible oral nanocarriers. *Scientific Reports* **7**: 1-14.
- Hoerstrup, S.P., Sodian, R., Daebritz, S., Wang, J., Bacha, E.A., Martin, D.P., et al. (2000) Functional living trileaflet heart valves grown *in vitro*. *Circulation* **102**: 44-49.
- Horcajada, P., Chalati, T., Serre, C., Gillet, B., Sebrie, C., Baati, T., et al. (2010) Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nature Materials* **9**: 172–178.
- Horcajada, P., Serre, C., Maurin, G., Ramsahye, N.A., Balas, F., Vallet-Regí, M., et al. (2008) Flexible porous metal-organic frameworks for a controlled Drug Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **130**: 6774–6780.
- Hoskins, B.F. and Robson, R. (1989) Infinite polymeric frameworks consisting of three dimensionally linked rod-like segments. *J. Am. Chem. Soc.* **111**: 5962–5964.
- Hoyle, C.E. and Bowman, C.N. (2010) Thiol–ene click chemistry. *Angewandte Chemie International Edition* **49**: 1540–1573.
- Hu, D., Chung, A.-L., Wu, L.-P., Zhang, X., Wu, Q., Chen, J.-C., and Chen, G.-Q. (2011) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate block copolymer P3HB-*b*-P4HB. *Biomacromolecules* **12**: 3166–3173.
- Hu, Y.-J., Wei, X., Zhao, W., Liu, Y.-S., and Chen, G.-Q. (2009) Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) with bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia* **5**: 1115–1125.
- Huang, W., Wang, Y., Ren, L., Du, C., and Shi, X. (2009) A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. *Materials Science and Engineering: C* **29**: 2221–2225.
- Huber, J.A., Welch, D.B.M., Morrison, H.G., Huse, S.M., Neal, P.R., Butterfield, D.A., and Sogin, M.L. (2007) Microbial population structures in the deep marine biosphere. *Science* **318**: 97–100.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., et al. (2016) A new view of the tree of life. *Nature Microbiology* **1**: 1-6.
- Huijberts, G.N., Eggink, G., Waard, P. de, Huisman, G.W., and Witholt, B. (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 536–544.
- Huisman, G.W., Wonink, E., Meima, R., Kazemier, B., Terpstra, P., and Witholt, B. (1991) Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*.

- Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 2191–2198.
- Huu Phong, T., Van Thuoc, D., and Sudesh, K. (2016) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia* sp. ND199 from different carbon sources. *International Journal of Biological Macromolecules* **84**: 361–366.
- Huxford, R.C., Della Rocca, J., and Lin, W. (2010) Metal–organic frameworks as potential drug carriers. *Current Opinion in Chemical Biology* **14**: 262–268.
- Imamura, T., Kenmoku, T., Honma, T., Kobayashi, S., and Yano, T. (2001) Direct biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) bearing epoxide groups. *International Journal of Biological Macromolecules* **29**: 295–301.
- Immordino, M.L., Dosio, F., and Cattell, L. (2006) Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine* **1**: 297–315.
- Iqbal, B., Khan, N., and Jamil, N. (2016) Polyhydroxybutyrate production by *Stenotrophomonas* and *Exiguobacterium* using renewable carbon source. *Annual Research & Review in Biology* **9**: 1–9.
- Ivars-Martinez, E., Martin-Cuadrado, A.-B., D’Auria, G., Mira, A., Ferriera, S., Johnson, J. (2008) Comparative genomics of two ecotypes of the marine planktonic copiotroph *Alteromonas macleodii* suggests alternative lifestyles associated with different kinds of particulate organic matter. *The ISME Journal* **2**: 1194–1212.
- James, S.R., Dobson, S.J., Franzmann, P.D., and McMeekin, T.A. (1990) *Halomonas meridiana*, a new species of extremely halotolerant bacteria isolated from Antarctic saline lakes. *Systematic and Applied Microbiology* **13**: 270–278.
- Jana, S., Simari, R.D., Spoon, D.B., and Lerman, A. (2014) Drug delivery in aortic valve tissue engineering. *Journal of Controlled Release* **196**: 307–323.
- Jannasch, H.W. (2013) Microbial interactions with hydrothermal fluids. *Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, Chemical, Biological, and Geological Interactions* **91**: 273–296.
- Jebbar, M., Franzetti, B., Girard, E., and Oger, P. (2015) Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles* **19**: 721–740.
- Jendrossek, D. and Pfeiffer, D. (2014) New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology* **16**: 2357–2373.
- Jenkins, S.J., Ruckerl, D., Cook, P.C., Jones, L.H., Finkelman, F.D., Rooijen, N. van, et al. (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**: 1284–1288.
- Jiang, G., Hill, D., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., and Radecka, I. (2016) Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 1157–1178.
- Jørgensen, B.B. and Boetius, A. (2007) Feast and famine — microbial life in the deep-sea bed. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 770–781.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., and Okon, Y. (2003) Involvement of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3244–3250.

- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y., and Castro-Sowinski, S. (2005) Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* **31**: 55–67.
- Kai, D. and Loh, X.J. (2014) Polyhydroxyalkanoates: chemical modifications toward biomedical applications. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2**: 106–119.
- Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S.E., and Singh, S.P. (2007) Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. *Macromolecular Bioscience* **7**: 255–277.
- Kalia, V.C., Lal, S., and Cheema, S. (2007) Insight into the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer. *Gene* **389**: 19–26.
- Kamal, R.M., Noorden, M.S. van, Franzek, E., Dijkstra, B.A.G., Loonen, A.J.M., and Jong, C.A.J.D. (2016) The neurobiological mechanisms of gamma-hydroxybutyrate dependence and withdrawal and their clinical relevance: a review. *NPS* **73**: 65–80.
- Kämpf, M.M., Thöny-Meyer, L., and Ren, Q. (2014) Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glycerol is stimulated by propionic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* **71**: 8–13.
- Kang, H.O., Chung, C.W., Kim, H.W., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H. (2001) Cometabolic biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxyvalerate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. DSY-82. *Antonie Van Leeuwenhoek* **80**: 185–191.
- Kassab, A.C., Pişkin, E., Bilgiç, S., Denkbaş, E.B., and Xu, K. (1999) Embolization with polyhydroxybutyrate (PHB) microspheres: *in vivo* studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **14**: 291–303.
- Kassab, A.C., Xu, K., Denkbas, E.B., Dou, Y., Zhao, S., and Piskin, E. (1997) Rifampicin carrying polyhydroxybutyrate microspheres as a potential chemoembolization agent. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **8**: 947–961.
- Kaye, J.Z. and Baross, J.A. (2000) High incidence of halotolerant bacteria in Pacific hydrothermal-vent and pelagic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 249–260.
- Kellerhals, M.B., Kessler, B., Witholt, B., Tchouboukov, A., and Brandl, H. (2000) Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales. *Macromolecules* **33**: 4690–4698.
- Kelley, D.S., Karson, J.A., Blackman, D.K., Früh-Green, G.L., Butterfield, D.A., Lilley, M.D. (2001) An off-axis hydrothermal vent field near the Mid-Atlantic Ridge at 30° N. *Nature* **412**: 145–149.
- Keshavarz, T. and Roy, I. (2010) Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology* **13**: 321–326.
- Kim, D.Y., Kim, and Rhee, Y.H. (1998) Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates) bearing carbon-carbon triple bonds. *Macromolecules* **31**: 4760–4763.
- Kim, D.Y., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H. (2000) Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *International Journal of Biological Macromolecules* **28**: 23–29.
- Kim, H.W., Chung, C.W., Kim, Y.B., and Rhee, Y.H. (2005) Preparation and hydrolytic degradation of semi-interpenetrating networks of poly(3-hydroxyundecenoate) and poly(lactide-co-glycolide). *International Journal of Biological Macromolecules* **37**: 221–226.

- Kim, J., Kim, Y.-J., Choi, S.Y., Lee, S.Y., and Kim, K.-J. (2017) Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal* **12**: 1-12.
- Kim, O., Gross, R.A., Hammar, W.J., and Newmark, R.A. (1996) Microbial synthesis of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) containing fluorinated side-chain substituents. *Macromolecules* **29**: 4572–4581.
- Kim, Y.B., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1995) Poly-3-Hydroxyalkanoates containing unsaturated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **33**: 1367–1374.
- Kim, Y.B., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1992) Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) copolymers containing brominated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **25**: 1852–1857.
- Kim, Y.B., Rhee, Y.-H., Lenz, R.W., and Fuller, R.C. (1997) Poly(3-hydroxyalkanoate)s produced by *Pseudomonas oleovorans* grown by feeding nonanoic and 10-undecenoic acids in sequence. *Polymer Journal* **29**: 894–898.
- Klose, J., Polz, M.F., Wagner, M., Schimak, M.P., Gollner, S., and Bright, M. (2015) Endosymbionts escape dead hydrothermal vent tubeworms to enrich the free-living population. *PNAS* **112**: 11300–11305.
- Knoll, A.H. (2015) Life on a young planet: the first three billion years of evolution on Earth. *Princeton University Press*.
- Köse, G.T., Korkusuz, F., Korkusuz, P., and Hasirci, V. (2004) *In vivo* tissue engineering of bone using poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) and collagen scaffolds. *Tissue Engineering* **10**: 1234–1250.
- Kumar, S. and Thakur, K. (2017) Bioplastics - classification, production and their potential food application. *Journal of Hill Agriculture* **8**: 118–129.
- Kunioka, M., Kawaguchi, Y., and Doi, Y. (1989) Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**: 569–573.
- Kurmoo, M. (2009) Magnetic metal–organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **38**: 1353–1379.
- Kurth, N., Renard, E., Brachet, F., Robic, D., Guerin, P., and Bourbouze, R. (2002) Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer* **43**: 1095–1101.
- Kutralam-Muniasamy, G., Corona-Hernandez, J., Narayanasamy, R.-K., Marsch, R., and Pérez-Guevara, F. (2017) Phylogenetic diversification and developmental implications of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate gene cluster assembly in prokaryotes. *FEMS microbiology letters* **364**: 1-28.
- Labet, M. and Thielemans, W. (2009) Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chem. Soc. Rev.* **38**: 3484–3504.
- Lageveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., and Witholt, B. (1988) Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2924–2932.
- Lam, J., Herant, M., Dembo, M., and Heinrich, V. (2009) Baseline mechanical characterization of J774 macrophages. *Biophys J* **96**: 248–254.
- Lao, H.-K., Renard, E., Fagui, A.E., Langlois, V., Vallée-Rehel, K., and Linossier, I. (2011) Functionalization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films via surface-

- initiated atom transfer radical polymerization: comparison with the conventional free-radical grafting procedure. *Journal of Applied Polymer Science* **120**: 184–194.
- Lao, H.-K., Renard, E., Langlois, V., Vallée-Rehel, K., and Linossier, I. (2010) Surface functionalization of PHBV by HEMA grafting via UV treatment: comparison with thermal free radical polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* **116**: 288–297.
- Lao, H.-K., Renard, E., Linossier, I., Langlois, V., and Vallée-Rehel, K. (2007) Modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film by chemical graft copolymerization. *Biomacromolecules* **8**: 416–423.
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., and Lant, P. (2013) The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science* **38**: 536–583.
- Le Meur, S., Zinn, M., Egli, T., Thöny-Meyer, L., and Ren, Q. (2014) Improved productivity of poly(4-hydroxybutyrate)(P4HB) in recombinant *Escherichia coli* using glycerol as the growth substrate with fed-batch culture. *Microbial cell factories* **13**: 131-143.
- Le Meur, S., Zinn, M., Egli, T., Thöny-Meyer, L., and Ren, Q. (2013) Poly(4-hydroxybutyrate)(P4HB) production in recombinant *Escherichia coli*: P4HB synthesis is uncoupled with cell growth. *Microbial cell factories* **12**: 123-134.
- Lebre, P.H., Maayer, P.D., and Cowan, D.A. (2017) Xerotolerant bacteria: surviving through a dry spell. *Nature Reviews Microbiology* **15**: 285–296.
- Lee, J., Farha, O.K., Roberts, J., Scheidt, K.A., Nguyen, S.T., and Hupp, J.T. (2009) Metal-organic framework materials as catalysts. *Chemical Society Reviews* **38**: 1450-1459.
- Lee, M.Y. and Park, W.H. (2000) Preparation of bacterial copolyesters with improved hydrophilicity by carboxylation. *Macromolecular Chemistry and Physics* **201**: 2771–2774.
- Lee, M.Y., Park, W.H., and Lenz, R.W. (2000) Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups. *Polymer* **41**: 1703–1709.
- Lee, S.Y., Choi, J., and Wong, H.H. (1999) Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**: 31–36.
- Lee, W.-H., Azizan, M.N.M., and Sudesh, K. (2004) Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability* **84**: 129–134.
- Lemechko, P., Ramier, J., Versace, D.L., Guezennec, J., Simon-Colin, C., Albanese, P., et al. (2013) Designing exopolysaccharide-graft-poly(3-hydroxyalkanoate) copolymers for electrospun scaffolds. *Reactive and Functional Polymers* **73**: 237–243.
- Lemoigne, M. (1927) Etudes sur l'autolyse microbienne. Origine de l'acide 1-oxobutyrique formé par autolyse. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* **41**: 148–168.
- Lemoigne, M. (1926) Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acide béta-oxybutyrique. *Bulletins de la Société de Chimie Biologique* **8**: 770–782.
- Lemos, P.C., Viana, C., Salgueiro, E.N., Ramos, A.M., Crespo, J.P.S., and Reis, M.A.M. (1998) Effect of carbon source on the formation of polyhydroxyalkanoates (PHA) by a phosphate-accumulating mixed culture. *Enzyme and Microbial Technology* **22**: 662–671.
- Lenz, R.W., Kim, Y.B., and Fuller, R.C. (1992) Production of unusual bacterial polyesters by *Pseudomonas oleovorans* through cometabolism. *FEMS Microbiology Letters* **103**: 207–214.

- Levine, A.C., Heberlig, G.W., and Nomura, C.T. (2016) Use of thiol-ene click chemistry to modify mechanical and thermal properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *International Journal of Biological Macromolecules* **83**: 358–365.
- Levine, A.C., Sparano, A., Twigg, F.F., Numata, K., and Nomura, C.T. (2015) Influence of cross-linking on the physical properties and cytotoxicity of polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds for tissue engineering. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **1**: 567–576.
- Li, H. and Chang, J. (2005) Preparation, characterization and *in vitro* release of gentamicin from PHBV/wollastonite composite microspheres. *Journal of Controlled Release* **107**: 463–473.
- Li, X., Chang, H., Luo, H., Wang, Z., Zheng, G., Lu, X., et al. (2015) Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds coated with PhaP-RGD fusion protein promotes the proliferation and chondrogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **103**: 1169–1175.
- Li, X., Fu, S., Yu, J., Fu, K., Chen, Y., Zhang, R., and Liu, Y. (2010) Isolation and identification of a polyhydroxyalkanoate producing strain. *Wei Sheng Wu Xue Bao* **50**: 1488–1493.
- Li, X., Guo, T., Lachmanski, L., Manoli, F., Menendez-Miranda, M., Manet, I., et al. (2017) Cyclodextrin-based metal-organic frameworks particles as efficient carriers for lansoprazole: study of morphology and chemical composition of individual particles. *International Journal of Pharmaceutics* **531**: 424–432.
- Li, Z. and Loh, X.J. (2016) Recent advances of using polyhydroxyalkanoate-based nanovehicles as therapeutic delivery carriers. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **9**: 1-22.
- Li, Z. and Loh, X.J. (2015) Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chem. Soc. Rev.* **44**: 2865–2879.
- Li, Z., Yang, J., and Loh, X.J. (2016) Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* **8**: 1-20.
- Liljeqvist, M., Ossandon, F.J., González, C., Rajan, S., Stell, A., Valdes, J., et al. (2015) Metagenomic analysis reveals adaptations to a cold-adapted lifestyle in a low-temperature acid mine drainage stream. *FEMS Microbiol Ecol* **91**: 1-12.
- Lin, N., Huang, J., and Dufresne, A. (2012) Preparation, properties and applications of polysaccharide nanocrystals in advanced functional nanomaterials: a review. *Nanoscale* **4**: 3274–3294.
- Liu, B., He, Y., Han, L., Singh, V., Xu, Xiaonan, Guo, T., et al. (2017) Microwave-assisted rapid synthesis of  $\gamma$ -cyclodextrin metal-organic frameworks for size control and efficient drug loading. *Crystal Growth & Design* **17**: 1654–1660.
- Liu, G., Sun, J., Zhang, J., Tu, Y., and Bao, J. (2015) High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology* **198**: 803–810.
- Lizarraga-Valderrama, L.R., Nigmatullin, R., Taylor, C., Haycock, J.W., Claeysens, F., Knowles, J.C., and Roy, I. (2015) Nerve tissue engineering using blends of poly(3-hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Engineering in Life Sciences* **15**: 612–621.
- López, N.I., Floccari, M.E., Steinbüchel, A., García, A.F., and Méndez, B.S. (1995) Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiology Ecology* **16**: 95–102.

- López, N.I., Pettinari, M.J., Nickel, P.I., and Méndez, B.S. (2015) Chapter Three - Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. *Advances in Applied Microbiology* **93**: 73–106.
- López-Cortés, A., Rodríguez-Fernández, O., Latisnere-Barragán, H., Mejía-Ruiz, H.C., González-Gutiérrez, G., and Lomelí-Ortega, C. (2010) Characterization of polyhydroxyalkanoate and the phaC gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26**: 109–118.
- López-López, A., Bartual, S.G., Stal, L., Onyshchenko, O., and Rodríguez-Valera, F. (2005) Genetic analysis of housekeeping genes reveals a deep-sea ecotype of *Alteromonas macleodii* in the Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology* **7**: 649–659.
- Lowe, A.B. (2014) Thiol–ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis: a first update. *Polym. Chem.* **5**: 4820–4870.
- Lu, J., Tappel, R.C., and Nomura, C.T. (2009) Mini-Review: biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews* **49**: 226–248.
- Lu, X.-Y., Li, M.-C., Zhu, X.-L., Fan, F., Wang, L.-L., and Ma, J.-G. (2014) Microbial synthesized biodegradable PHBHHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor. *BMC biotechnology* **14**: 1-10.
- Luklinska, Z.B. and Bonfield, W. (1997) Morphology and ultrastructure of the interface between hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite implant and bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **8**: 379–383.
- Lundgren, D.G., Alper, R., Schnaitman, C., and Marchessault, R.H. (1965) Characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate extracted from different bacteria. *Journal of Bacteriology* **89**: 245–251.
- Lundgren, D.G., Pfister, R.M., and Merrick, J.M. (1964) Structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules. *Microbiology* **34**: 441–446.
- Lutz, J.-F. (2008) Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: toward new generations of smart biocompatible materials. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **46**: 3459–3470.
- Macieira, S., Zhang, J., Buckel, W., and Messerschmidt, A. (2012) Crystal structure of the complex between 4-hydroxybutyrate CoA-transferase from *Clostridium aminobutyricum* and CoA. *Archives of Microbiology* **194**: 157–166.
- Macieira, S., Zhang, J., Velarde, M., Buckel, W., and Messerschmidt, A. (2009) Crystal structure of 4-hydroxybutyrate CoA-transferase from *Clostridium aminobutyricum*. *Biological Chemistry* **390**:
- Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T., and Doi, Y. (2002) A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *Journal of Bacteriology* **184**: 3992–4002.
- Maitre, M. (1997) The  $\gamma$ -hydroxybutyrate signaling system in brain: organization and functional implications. *Progress in Neurobiology* **51**: 337–361.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., et al. (2003) Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. *The Lancet* **361**: 743–749.
- Mamelak, M. (1989) Gammahydroxybutyrate: an endogenous regulator of energy metabolism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **13**: 187–198.
- Marles-Wright, J. and Lewis, R.J. (2007) Stress responses of bacteria. *Current Opinion in Structural Biology* **17**: 755–760.

- Martin, D., Bartlett, D.H., and Roberts, M.F. (2002) Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. *Extremophiles* **6**: 507–514.
- Martin, D.P. and Williams, S.F. (2003) Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* **16**: 97–105.
- Masaeli, E., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M.H., Sadri, S., Hilderink, J., van Apeldoorn, A., et al. (2013) Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly(hydroxyalkanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *PLoS ONE* **8**: 1-13.
- Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Fatima, N., Hasan, F., and Hameed, A. (2013) Encapsulation of ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its *in vitro* application. *Materials Science and Engineering: C* **33**: 1054–1060.
- Masood, F., Yasin, T., and Hameed, A. (2015) Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology* **35**: 514–521.
- Matallana-Surget, S., Villette, C., Intertaglia, L., Joux, F., Bourrain, M., and Lebaron, P. (2012) Response to UVB radiation and oxidative stress of marine bacteria isolated from South Pacific Ocean and Mediterranean Sea. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **117**: 254–261.
- Matin, A., Veldhuis, C., Stegeman, V., and Veenhuis, M. (1979) Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *Microbiology* **112**: 349–355.
- McCool, G.J. and Cannon, M.C. (1999) Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of bacteriology* **181**: 585–592.
- Meier, D.V., Bach, W., Girguis, P.R., Gruber-Vodicka, H.R., Reeves, E.P., Richter, M., et al. (2016) Heterotrophic Proteobacteria in the vicinity of diffuse hydrothermal venting. *Environmental Microbiology* **18**: 4348–4368.
- Meng, D.-C., Shen, R., Yao, H., Chen, J.-C., Wu, Q., and Chen, G.-Q. (2014) Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology* **29**: 24–33.
- Meng, D.-C., Shi, Z.-Y., Wu, L.-P., Zhou, Q., Wu, Q., Chen, J.-C., and Chen, G.-Q. (2012) Production and characterization of poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway. *Metabolic Engineering* **14**: 317–324.
- Mévellec, V., Roussel, S., Tessier, L., Chancolon, J., Mayne-L’Hermite, M., Deniau, G., et al. (2007) Grafting polymers on surfaces: a new powerful and versatile diazonium salt-based one-step process in aqueous media. *Chem. Mater.* **19**: 6323–6330.
- Mezzina, M.P. and Pettinari, M.J. (2016) Phasins, the multifacetic polyhydroxyalkanoate granule associated proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 5060-5067.
- Misra, S.K., Valappil, S.P., Roy, I., and Boccaccini, A.R. (2006) Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* **7**: 2249–2258.
- Modjinou, T., Lemechko, P., Babinot, J., Versace, D.-L., Langlois, V., and Renard, E. (2015) Poly(3-hydroxyalkanoate) sulfonate: from nanoparticles toward water soluble polyesters. *European Polymer Journal* **68**: 471–479.
- Mosahebi, A., Fuller, P., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2002) Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Experimental Neurology* **173**: 213–223.

- Mosahebi, A., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2003) Addition of fibronectin to alginate matrix improves peripheral nerve regeneration in tissue-engineered conduits. *Tissue Engineering* **9**: 209–218.
- Müller, H.-M. and Seebach, D. (1993) Poly(hydroxyalkanoates): a fifth class of physiologically important organic biopolymers? *Angewandte Chemie International Edition* **32**: 477–502.
- Murueva, A.V., Shishatskaya, E.I., Kuzmina, A.M., Volova, T.G., and Sinskey, A.J. (2013) Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **24**: 1905–1915.
- Nigmatullin, R., Thomas, P., Lukasiewicz, B., Puthussery, H., and Roy, I. (2015) Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in Drug Delivery. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **90**: 1209–1221.
- Nilsson, C., Simpson, N., Malkoch, M., Johansson, M., and Malmström, E. (2008) Synthesis and thiol–ene photopolymerization of allyl-ether functionalized dendrimers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **46**: 1339–1348.
- Nishikawa, T., Ogawa, K., Kohda, R., Zhixiong, W., Miyasaka, H., Umeda, F., et al. (2002) Cloning and molecular analysis of poly(3-Hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas aureofaciens*. *Curr Microbiol* **44**: 132–135.
- Novikov, L.N., Novikova, L.N., Mosahebi, A., Wiberg, M., Terenghi, G., and Kellerth, J.-O. (2002) A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials* **23**: 3369–3376.
- Numata, K., Morisaki, K., Tomizawa, S., Ohtani, M., Demura, T., Miyazaki, M., et al. (2013) Synthesis of poly- and oligo(hydroxyalkanoates)s by deep-sea bacteria, *Colwellia* spp., *Moritella* spp., and *Shewanella* spp. *Polymer Journal* **45**: 1094–1100.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., and Pernicova, I. (2018) Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: biotechnological consequences and applications. *Biotechnology Advances* **36**: 856–870.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Mravec, F., Samek, O., and Marova, I. (2016) Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 1365–1376.
- Oren, A. (2010) Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environmental Technology* **31**: 825–834.
- Ostle, A.-G. and Holt, J.G. (1982) Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and environmental Microbiology* **44**: 238–241.
- Pan, J., Li, G., Chen, Z., Chen, X., Zhu, W., and Xu, K. (2009) Alternative block polyurethanes based on poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol). *Biomaterials* **30**: 2975–2984.
- Park, W.H., Lenz, R.W., and Goodwin, S. (1998) Epoxidation of bacterial polyesters with unsaturated side chains. Production and epoxidation of polyesters from 10-undecenoic Acid. *Macromolecules* **31**: 1480–1486.
- Pärnänen, K., Karkman, A., Virta, M., Eronen-Rasimus, E., and Kaartokallio, H. (2015) Discovery of bacterial polyhydroxyalkanoate synthase (PhaC)-encoding genes from seasonal Baltic Sea ice and cold estuarine waters. *Extremophiles* **19**: 197–206.

- Passanha, P., Esteves, S., Kedia, G., Dinsdale, R., and Guwy, A. (2013) Increasing polyhydroxyalkanoate (PHA) yields from *Cupriavidus necator* by using filtered digestate liquors. *Bioresource Technology* **147**: 345–352.
- Pavez, P., Castillo, J.L., González, C., and Martínez, M. (2009) Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr Microbiol* **59**: 636–640.
- Pearce, B.K.D., Tupper, A.S., Pudritz, R.E., and Higgs, P.G. (2018) Constraining the time interval for the origin of life on Earth. *Astrobiology* **18**: 343–364.
- Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., et al. (2013) Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology* **32**: 128–141.
- Peelman, N., Ragaert, P., Ragaert, K., Meulenaer, B.D., Devlieghere, F., and Cardon, L. (2015) Heat resistance of new biobased polymeric materials, focusing on starch, cellulose, PLA, and PHA. *Journal of Applied Polymer Science* **132**: 42305–42320.
- Peoples, O.P. and Sinskey, A.J. (1989) Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *Journal of Biological Chemistry* **264**: 15298–15303.
- Perry, J.J., Perman, J.A., and Zaworotko, M.J. (2009) Design and synthesis of metal–organic frameworks using metal–organic polyhedra as supermolecular building blocks. *Chem. Soc. Rev.* **38**: 1400–1417.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., et al. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology* **24**: 1257–1262.
- Poletto, F.S., Fiel, L.A., Donida, B., Ré, M.I., Guterres, S.S., and Pohlmann, A.R. (2008) Controlling the size of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanoparticles prepared by emulsification–diffusion technique using ethanol as surface agent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **324**: 105–112.
- Pötter, M., Madkour, M.H., Mayer, F., and Steinbüchel, A. (2002) Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* **148**: 2413–2426.
- Pötter, M., Müller, H., and Steinbüchel, A. (2005) Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology* **151**: 825–833.
- Pouton, C.W. and Akhtar, S. (1996) Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **18**: 133–162.
- Prieto, A., Escapa, I.F., Martínez, V., Dinjaski, N., Herencias, C., Peña, F. de la, et al. (2016) A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology* **18**: 341–357.
- Prieto, M.A., Bühler, B., Jung, K., Witholt, B., and Kessler, B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *Journal of Bacteriology* **181**: 858–868.
- Qu, X.-H., Wu, Q., Zhang, K.-Y., and Chen, G.Q. (2006) In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. *Biomaterials* **27**: 3540–3548.

- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D., and Hatti-Kaul, R. (2010) Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 1687–1696.
- Raguénès, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P., and Barbier, G. (1997) *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **47**: 989–995.
- Raguénès, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., et al. (1996) Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 67–73.
- Raiger lustman, L.J., Tribelli, P.M., Ibarra, J.G., Catone, M.V., Solar Venero, E.C., and López, N.I. (2015) Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles* **19**: 207–220.
- Raiger-lustman, L.J. and Ruiz, J.A. (2008) The alternative sigma factor,  $\sigma_S$ , affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* **284**: 218–224.
- Ramier, J., Boudierlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., Langlois, V., et al. (2014) Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrospayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C* **38**: 161–169.
- Ramier, J., Grande, D., Boudierlique, T., Stoilova, O., Manolova, N., Rashkov, I., et al. (2014) From design of bio-based biocomposite electrospun scaffolds to osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **25**: 1563–1575.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dubé, B., Bataille, P., and Ramsay, J.A. (1990) Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2093–2098.
- Rathbone, S., Furrer, P., Lübber, J., Zinn, M., and Cartmell, S. (2010) Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **93A**: 1391–1403.
- Raza, Z.A., Riaz, S., and Banat, I.M. (2018) Polyhydroxyalkanoates: properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Biotechnology Progress* **34**: 29–41.
- Rehm, B.H. and Steinbüchel, A. (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International journal of biological macromolecules* **25**: 3–19.
- Rehm, B.H.A. (2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 578–592.
- Rehm, B.H.A. (2006) Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: the key role of polyester synthases. *Biotechnology Letters* **28**: 207–213.
- Rehm, B.H.A. (2003) Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal* **376**: 15–33.
- Renard, E., Poux, A., Timbart, L., Langlois, V., and Guérin, P. (2005) Preparation of a novel artificial bacterial polyester modified with pendant hydroxyl groups. *Biomacromolecules* **6**: 891–896.

- Renard, E., Ternat, C., Langlois, V., and Guerin, P. (2003) Synthesis of graft bacterial polyesters for nanoparticles preparation. *Macromolecular Bioscience* **3**: 248–252.
- Renard, E., Timbart, L., Vergnol, G., and Langlois, V. (2010) Role of carboxyl pendant groups of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoate)s in biomedical temporary applications. *Journal of Applied Polymer Science* **117**: 1888–1896.
- Ricotti, L., Polini, A., Genchi, G.G., Ciofani, G., Iandolo, D., Helena Vazão, et al. (2012) Proliferation and skeletal myotube formation capability of C2C12 and H9c2 cells on isotropic and anisotropic electrospun nanofibrous PHB scaffolds. *Biomed. Mater.* **7**: 1-12.
- Roberts, M.F. (2005) Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems* **5**: 1-30.
- Robinson, A.M. and Williamson, D.H. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiological Reviews* **60**: 143–187.
- Rószter, T. (2015) Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation* **15**: 1-16.
- Rowell, J.L.C. and Yaghi, O.M. (2005) Strategies for hydrogen storage in metal–organic frameworks. *Angewandte Chemie International Edition* **44**: 4670–4679.
- Ruiz, J.A., López, N.I., Fernández, R.O., and Méndez, B.S. (2001) Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 225–230.
- Ruiz, J.A., López, N.I., and Méndez, B.S. (2004) *rpoS* gene expression in carbon-starved cultures of the polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr Microbiol* **48**: 396–400.
- Saito, Y. and Doi, Y. (1994) Microbial synthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Comamonas acidovorans*. *International journal of biological macromolecules* **16**: 99–104.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**: 406–425.
- Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, M.C.M. (2004) Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances* **22**: 261–279.
- Sánchez-Porro, C., Kaur, B., Mann, H., and Ventosa, A. (2010) *Halomonas titanicae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from the RMS Titanic. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 2768–2774.
- Sangermano, M., Yagci, Y., and Rizza, G. (2007) *In Situ* synthesis of silver–epoxy nanocomposites by photoinduced electron transfer and cationic polymerization processes. *Macromolecules* **40**: 8827–8829.
- Sarker, U. and Oba, S. (2018) Drought stress effects on growth, ROS markers, compatible solutes, phenolics, flavonoids, and antioxidant activity in *Amaranthus tricolor*. *Appl Biochem Biotechnol.* **186**: 1-18.
- Sasidharan, R.S., Bhat, S.G., and Chandrasekaran, M. (2015) Biocompatible polyhydroxybutyrate (PHB) production by marine *Vibrio azureus* BTKB33 under submerged fermentation. *Ann Microbiol* **65**: 455–465.
- Sass, A.M., Sass, H., Coolen, M.J.L., Cypionka, H., and Overmann, J. (2001) Microbial communities in the chemocline of a hypersaline deep-sea basin (Urania basin, Mediterranean Sea). *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5392–5402.

- Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Kiran, G.S., Yang, Y.-H., and Selvin, J. (2017) Marine sponge-associated bacteria as a potential source for polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* **43**: 294–312.
- Scherf, U. and Buckel, W. (1991) Purification and properties of 4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase from *Clostridium aminobutyricum*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 2699–2702.
- Schlegel, H.-G., Lafferty, R., and Krauss, I. (1970) The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Archives of Microbiology* **71**: 283–294.
- Scholz, C. (2010) Perspectives to produce positively or negatively charged polyhydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 829–837.
- Scholz, C., Fuller, R.C., and Lenz, R.W. (1994) Growth and polymer incorporation of *Pseudomonas oleovorans* on alkyl esters of heptanoic acid. *Macromolecules* **27**: 2886–2889.
- Sendil, D., Gürsel, I., Wise, D.L., and Hasırcı, V. (1999) Antibiotic release from biodegradable PHBV microparticles. *Journal of Controlled Release* **59**: 207–217.
- Seo, Y.-K., Yoon, J.W., Lee, J.S., Lee, U.-H., Hwang, Y.K., Jun, C.-H., et al. (2012) Large scale fluorine-free synthesis of hierarchically porous iron(III) trimesate MIL-100(Fe) with a zeolite MTN topology. *Microporous and Mesoporous Materials* **157**: 137–145.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., and Ahmed, S. (2008) Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances* **26**: 246–265.
- Shah, M., Choi, M.H., Ullah, N., Kim, M.O., and Yoon, S.C. (2011) Synthesis and characterization of PHV-block-mPEG diblock copolymer and its formation of amphiphilic nanoparticles for Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **11**: 5702–5710.
- Shah, M., Naseer, M.I., Choi, M.H., Kim, M.O., and Yoon, S.C. (2010) Amphiphilic PHA–mPEG copolymeric nanocontainers for drug delivery: preparation, characterization and *in vitro* evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* **400**: 165–175.
- Shah, M., Ullah, N., Choi, M.H., Kim, M.O., and Yoon, S.C. (2012) Amorphous amphiphilic P(3HV-co-4HB)-b-mPEG block copolymer synthesized from bacterial copolyester *via* melt transesterification: nanoparticle preparation, cisplatin-loading for cancer therapy and *in vitro* evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **80**: 518–527.
- Shamala, T.R., Chandrashekar, A., Vijayendra, S.V.N., and Kshama, L. (2003) Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of applied microbiology* **94**: 369–374.
- Shantini, K., Huong, K.-H., Ramachandran, H., and Amirul, A.A. (2015) Microbial production of polyhydroxyalkanoates for agricultural and aquacultural applications. *Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas* : 129–164.
- Sheu, D.-S., Lai, Y.-W., Chang, R.-C., and Chen, W.-M. (2009) Detection of polyhydroxyalkanoate synthase activity on a polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry* **393**: 62–66.
- Sheu, D.-S., Wang, Y.-T., and Lee, C.-Y. (2000) Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* **146**: 2019–2025.
- Shishatskaya, E.I., Khlusov, I.A., and Volova, T.G. (2006) A hybrid PHB–hydroxyapatite composite for biomedical application: production, *in vitro* and *in vivo* investigation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **17**: 481–498.

- Shum-Tim, D., Stock, U., Hrkach, J., Shinoka, T., Lien, J., Moses, M.A., et al. (1999) Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *The Annals of Thoracic Surgery* **68**: 2298–2304.
- da Silva, M.A.C., Cavalett, A., Spinner, A., Rosa, D.C., Jasper, R.B., Quecine, M.C., et al. (2013) Phylogenetic identification of marine bacteria isolated from deep-sea sediments of the eastern South Atlantic Ocean. *SpringerPlus* **2**: 127.
- Simon-Colin, C., Alain, K., Raguénès, G., Schmitt, S., Kervarec, N., Gouin, C., et al. (2009) Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl PHAs) from cosmetic co-products by *Pseudomonas raguenesii* sp. nov., isolated from Tetiaroa, French Polynesia. *Bioresource Technology* **100**: 6033–6039.
- Simon-Colin, Christelle, Raguénès, G., Costa, B., and Guezennec, J. (2008) Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezennei* from various carbon sources. *Reactive and Functional Polymers* **68**: 1534–1541.
- Simon-Colin, C., Raguénès, G., Cozien, J., and Guezennec, J.G. (2008) *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of Applied Microbiology* **104**: 1425–1432.
- Simon-Colin, Christelle, Raguénès, G., Crassous, P., Moppert, X., and Guezennec, J. (2008) A novel mcl-PHA produced on coprah oil by *Pseudomonas guezennei* biovar. *tikehau*, isolated from a “kopara” mat of French Polynesia. *International Journal of Biological Macromolecules* **43**: 176–181.
- Singh, M., Patel, S.K., and Kalia, V.C. (2009) *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories* **8**: 38.
- Slater, S., Houmiel, K.L., Tran, M., Mitsky, T.A., Taylor, N.B., Padgette, S.R., and Gruys, K.J. (1998) Multiple  $\beta$ -ketothiolases mediate poly( $\beta$ -Hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology* **180**: 1979–1987.
- Sodian, R., Hoerstrup, S.P., Sperling, J.S., Daebritz, S., Martin, D.P., Moran, A.M., et al. (2000) Early *in vivo* experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation* **102**: 22–29.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., et al. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 12115–12120.
- Söhling, B. and Gottschalk, G. (1996) Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *Journal of bacteriology* **178**: 871–880.
- Solaiman, D.K. (2002) Polymerase-chain-reaction-based detection of individual polyhydroxyalkanoate synthase *phaC1* and *phaC2* genes. *Biotechnology letters* **24**: 245–250.
- Solaiman, D.K., Ashby, R.D., and Foglia, T.A. (2000) Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology* **53**: 690–694.
- Solaiman, D.K.Y. and Ashby, R.D. (2005) Rapid genetic characterization of poly(hydroxyalkanoate) synthase and its applications. *Biomacromolecules* **6**: 532–537.
- Song, S., Hein, S., and Steinbüchel, A. (1999) Production of poly (4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* **21**: 193–197.

- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., and Rudzinski, W.E. (2001) Biodegradable polymeric nanoparticles as Drug Delivery devices. *Journal of Controlled Release* **70**: 1–20.
- Soto, G., Setten, L., Lisi, C., Maurelis, C., Mozzicafreddo, M., Cuccioloni, M., et al. (2012) Hydroxybutyrate prevents protein aggregation in the halotolerant bacterium *Pseudomonas* sp. CT13 under abiotic stress. *Extremophiles* **16**: 455–462.
- Sparks, J. and Scholz, C. (2009) Evaluation of a cationic poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) as a plasmid DNA delivery system. *Biomacromolecules* **10**: 1715–1719.
- Sparks, J. and Scholz, C. (2008) Synthesis and characterization of a cationic poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate). *Biomacromolecules* **9**: 2091–2096.
- Spiekermann, P., Rehm, B.H., Kalscheuer, R., Baumeister, D., and Steinbüchel, A. (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology* **171**: 73–80.
- Stamm, C., Khosravi, A., Grabow, N., Schmohl, K., Treckmann, N., Drechsel, A., et al. (2004) Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *The Annals of Thoracic Surgery* **78**: 2084–2093.
- Steinbüchel, A. (2001) Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromolecular Bioscience* **1**: 1–24.
- Steinbüchel, A. and Lütke-Eversloh, T. (2003) Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* **16**: 81–96.
- Steinbüchel, A. and Valentin, H.E. (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters* **128**: 219–228.
- Steinbüchel, A., Valentin, H.E., and Schönebaum, A. (1994) Application of recombinant gene technology for production of polyhydroxyalkanoic acids: biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) homopolyester. *J Environ Polym Degr* **2**: 67–74.
- Stewart, F.J., Newton, I.L.G., and Cavanaugh, C.M. (2005) Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic–anoxic interfaces. *Trends in Microbiology* **13**: 439–448.
- Stigers, D.J. and Tew, G.N. (2003) Poly(3-hydroxyalkanoate)s functionalized with carboxylic acid groups in the side chain. *Biomacromolecules* **4**: 193–195.
- Stock, U.A., Nagashima, M., Khalil, P.N., Nollert, G.D., Herden, T., Sperling, J.S., et al. (2000) Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **119**: 732–740.
- Stock, U.A., Sakamoto, T., Hatsuoka, S., Martin, D.P., Nagashima, M., Moran, A.M. (2000) Patch augmentation of the pulmonary artery with bioabsorbable polymers and autologous cell seeding. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **120**: 1158–1167.
- Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* **25**: 1503–1555.
- Sun, J., Wu, J., Li, H., and Chang, J. (2005) Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for cartilage tissue engineering. *European Polymer Journal* **41**: 2443–2449.

- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., and Shah, S. (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances* **25**: 148–175.
- Takai, K. and Horikoshi, K. (1999) Genetic diversity of Archaea in deep-sea hydrothermal vent environments. *Genetics* **152**: 1285–1297.
- Tamames-Tabar, C., Cunha, D., Imbuluzqueta, E., Ragon, F., Serre, C., Blanco-Prieto, M.J., and Horcajada, P. (2013) Cytotoxicity of nanoscaled metal–organic frameworks. *J. Mater. Chem. B* **2**: 262–271.
- Thomas, C.M. and Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 711–721.
- Timm, A. and Steinbüchel, A. (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360–3367.
- Tobin, K.M. and O'Connor, K.E. (2005) Polyhydroxyalkanoate accumulating diversity of *Pseudomonas* species utilising aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 111–118.
- Tripathi, L., Wu, L.-P., Meng, D., Chen, J., and Chen, G.-Q. (2013) Biosynthesis and characterization of diblock copolymer of P(3-Hydroxypropionate)-*block*-P(4-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli*. *Biomacromolecules* **14**: 862–870.
- Tseng, C.-L., Chen, H.-J., and Shaw, G.-C. (2006) Identification and characterization of the *Bacillus thuringiensis phaZ* gene, encoding new intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase. *Journal of Bacteriology* **188**: 7592–7599.
- Tsuge, T. (2002) Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**: 579–584.
- Tsuge, T., Hyakutake, M., and Mizuno, K. (2015) Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 6231–6240.
- Türesin, F., Gürsel, I., and Hasirci, V. (2001) Biodegradable polyhydroxyalkanoate implants for osteomyelitis therapy: *in vitro* antibiotic release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **12**: 195–207.
- Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C., and Roy, I. (2006) Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**: 1–17.
- Valentin, H.E., Zwingmann, G., Schönebaum, A., and Steinbüchel, A. (1995) Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *European Journal of Biochemistry* **227**: 43–60.
- Van Dover, C.L. (2014) Impacts of anthropogenic disturbances at deep-sea hydrothermal vent ecosystems: a review. *Marine Environmental Research* **102**: 59–72.
- Van-Thuoc, D., Hashim, S.O., Hatti-Kaul, R., and Mamo, G. (2013) Ectoine-mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress: a study using *Bacillus halodurans* xylanase as a model. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 6271–6278.
- Vergnol, G., Sow, H., Renard, E., Haroun, F., and Langlois, V. (2012) Multilayer approach for tuning the Drug Delivery from poly(3-hydroxyalkanoate)s coatings. *Reactive and Functional Polymers* **72**: 260–267.

- Versace, D.-L., Dubot, P., Cenedese, P., Lalevée, J., Soppera, O., Malval, J.-P., et al. (2012) Natural biopolymer surface of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-photoinduced modification with triarylsulfonium salts. *Green Chem.* **14**: 788–798.
- Villanueva, L., Del Campo, J., and Guerrero, R. (2010) Diversity and physiology of polyhydroxyalkanoate-producing and -degrading strains in microbial mats: Polyhydroxyalkanoate producers and degraders in mats. *FEMS Microbiology Ecology* **74**: 42–54.
- Volova, T., Goncharov, D., Sukovaty, A., Shabanov, A., Nikolaeva, E., and Shishatskaya, E. (2014) Electrospinning of polyhydroxyalkanoate fibrous scaffolds: effects on electrospinning parameters on structure and properties. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **25**: 370–393.
- Volova, T., Shishatskaya, E., Sevastianov, V., Efremov, S., and Mogilnaya, O. (2003) Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers. *Biochemical Engineering Journal* **16**: 125–133.
- Vyrides, I. and Stuckey, D.C. (2017) Compatible solute addition to biological systems treating waste/wastewater to counteract osmotic and other environmental stresses: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* **37**: 865–879.
- Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., Takabe, T. (2016) Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology* **2**: 42–54.
- Wang, W.S. and Lundgren, D.G. (1969) Poly-beta-hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* **97**: 947–950.
- Wang, X.-G., Dong, Z.-Y., Cheng, H., Wan, S.-S., Chen, W.-H., Zou, M.-Z., et al. (2015) A multifunctional metal–organic framework based tumor targeting Drug Delivery system for cancer therapy. *Nanoscale* **7**: 16061–16070.
- Wang, Y., Bian, Y.-Z., Wu, Q., and Chen, G.-Q. (2008) Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* **29**: 2858–2868.
- Wang, Y., Jiang, X.-L., Yang, S.-C., Lin, X., He, Y., Yan, C., et al. (2011) MicroRNAs in the regulation of interfacial behaviors of MSCs cultured on microgrooved surface pattern. *Biomaterials* **32**: 9207–9217.
- Wang, Zhixiong, Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., et al. (2003) Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**: 537–540.
- Wang, Zhixiong, Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., et al. (2003) Novel transdermal Drug Delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **95**: 541–543.
- Wee, C.Y., Liow, S.S., Li, Z., Wu, Y.-L., and Loh, X.J. (2017) New poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate] (P3HB4HB)-based thermogels. *Macromolecular Chemistry and Physics* **218**: 1700196.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* **173**: 697–703.
- Weng, Y.-X., Jin, Y.-J., Meng, Q.-Y., Wang, L., Zhang, M., and Wang, Y.-Z. (2013) Biodegradation behavior of poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT),

- poly(lactic acid) (PLA), and their blend under soil conditions. *Polymer Testing* **32**: 918–926.
- Wentzel, M., Lötter, L., Loewenthal, R., and Marais, G. (1986) Metabolic behaviour of *Acinetobacter* spp. in enhanced biological phosphorous removal - a biochemical model. *Water SA* **12**: 209–224.
- Williams, S.F., Rizk, S., and Martin, D.P. (2013) Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* **58**: 439–452.
- Witholt, B. and Kessler, B. (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 279–285.
- Wu, D., He, J., Gong, Y., Chen, D., Zhu, X., Qiu, N., et al. (2011) Proteomic analysis reveals the strategies of *Bacillus thuringiensis* YBT-1520 for survival under long-term heat stress. *PROTEOMICS* **11**: 2580–2591.
- Wu, M.-X. and Yang, Y.-W. (2017) Metal-organic framework (MOF)-based drug/cargo delivery and cancer therapy. *Advanced Materials* **29**: 1–20.
- Wu, Z., Hao, N., Zhang, H., Guo, Z., Liu, R., He, B., and Li, S. (2017) Mesoporous iron-carboxylate metal-organic frameworks synthesized by the double-template method as a nanocarrier platform for intratumoral drug delivery. *Biomater. Sci.* **5**: 1032–1040.
- Wuttke, S., Braig, S., Preiß, T., Zimpel, A., Sicklinger, J., Bellomo, C., et al. (2015) MOF nanoparticles coated by lipid bilayers and their uptake by cancer cells. *Chemical Communications* **51**: 15752–15755.
- Xie, Z., Ma, L., deKrafft, K.E., Jin, A., and Lin, W. (2010) Porous phosphorescent coordination polymers for oxygen sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **132**: 922–923.
- Xu, M., Wang, P., Wang, F., and Xiao, X. (2005) Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province. *Biodivers Conserv* **14**: 3363–3380.
- Xu, X.-Y., Li, X.-T., Peng, S.-W., Xiao, J.-F., Liu, C., Fang, G., et al. (2010) The behaviour of neural stem cells on polyhydroxyalkanoate nanofiber scaffolds. *Biomaterials* **31**: 3967–3975.
- Yagci, Y., Jockusch, S., and Turro, N.J. (2010) Photoinitiated polymerization: advances, challenges, and opportunities. *Macromolecules* **43**: 6245–6260.
- Yagmurlu, M.F., Korkusuz, F., Gürsel, I., Korkusuz, P., Örs, Ü., and Hasirci, V. (1999) Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: *in vivo* effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *Journal of Biomedical Materials Research* **46**: 494–503.
- Yamanashi, T., Iwata, M., Kamiya, N., Tsunetomi, K., Kajitani, N., Wada, N., et al. (2017) Beta-hydroxybutyrate, an endogenous NLRP3 inflammasome inhibitor, attenuates stress-induced behavioral and inflammatory responses. *Scientific Reports* **7**: 7677.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103–119.
- Yin, J., Chen, J.-C., Wu, Q., and Chen, G.-Q. (2015) Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. *Biotechnology Advances* **33**: 1433–1442.
- Yoon, J.-H., Park, S.E., Kang, S.-J., and Oh, T.-K. (2007) *Rheinheimera aquimaris* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1386–1390.

- York, G.M., Stubbe, J., and Sinskey, A.J. (2002) The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *Journal of Bacteriology* **184**: 59–66.
- Yue, H., Ling, C., Yang, T., Chen, X., Chen, Y., Deng, H., et al. (2014) A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology for Biofuels* **7**: 1-12.
- Yum, M.-S., Ko, T.-S., and Kim, D.W. (2012)  $\beta$ -Hydroxybutyrate increases the pilocarpine-induced seizure threshold in young mice. *Brain and Development* **34**: 181–184.
- Zalipsky, S. (1993) Synthesis of an end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjugate chemistry* **4**: 296–299.
- Zhang, X., Liu, X., Liang, Y., Guo, X., Xiao, Y., Ma, L., et al. (2017) Adaptive evolution of extreme acidophile *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* potentially driven by horizontal gene transfer and gene loss. *Appl. Environ. Microbiol.* 1-27.
- Zhao, K., Deng, Y., Chun Chen, J., and Chen, G.-Q. (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials* **24**: 1041–1045.
- Zhao, Y., Zou, B., Shi, Z., Wu, Q., and Chen, G.-Q. (2007) The effect of 3-hydroxybutyrate on the *in vitro* differentiation of murine osteoblast MC3T3-E1 and *in vivo* bone formation in ovariectomized rats. *Biomaterials* **28**: 3063–3073.
- Zhao, Y.H., Li, H.M., Qin, L.F., Wang, H.H., and Chen, G.-Q. (2007) Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Aeromonas hydrophila* reduces its survival ability under stress conditions. *FEMS Microbiol Lett* **276**: 34–41.
- Zhijiang, C., Chengwei, H., and Guang, Y. (2011) Crystallization behavior, thermal property and biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(ethylene glycol) grafting copolymer. *Polymer Degradation and Stability* **96**: 1602–1609.
- Zhijiang, C. and Zhihong, W. (2007) Preparation of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly(ethylene glycol) (PEG) graft copolymer. *J Mater Sci* **42**: 5886–5890.
- Zhou, X.-Y., Yuan, X.-X., Shi, Z.-Y., Meng, D.-C., Jiang, W.-J., Wu, L.-P. (2012) Hyperproduction of poly (4-hydroxybutyrate) from glucose by recombinant *Escherichia coli*. *Microbial cell factories* **11**: 1-8.
- Zimpel, A., Preiß, T., Röder, R., Engelke, H., Ingrish, M., Peller, M., et al. (2016) Imparting functionality to MOF nanoparticles by external surface selective covalent attachment of polymers. *Chemistry of Materials* **28**: 3318–3326.
- Zinn, M., Weilenmann, H.-U., Hany, R., Schmid, M., and Egli, T. (2003) Tailored synthesis of poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) in *Ralstonia eutropha* DSM 428. *Acta Biotechnologica* **23**: 309–316.
- Zinn, M., Witholt, B., and Egli, T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced drug delivery reviews* **53**: 5–21.

# VALORISATION SCIENTIFIQUE



# COMMUNICATIONS ORALES

## INTERNATIONALES

### 9<sup>th</sup> European Symposium on Biopolymers

*05.07/07/17 à Toulouse*

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Christelle SIMON-COLIN et Valérie LANGLOIS**

'PHAscl-producing bacteria from the marine environment: detection, production and valorization.'

### 16<sup>th</sup> International Pharmaceutical Microbiology and Biotechnology Conference

*21.23/05/18 à Vienne*

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Christelle SIMON-COLIN et Valérie LANGLOIS**

'PHA-producing bacteria from deep-sea environments: towards a new generation of therapeutics.'

## NATIONALES

### 36<sup>èmes</sup> Journées du Groupe Français des Polymères (Section Ouest)

*04.05/06/15 à Brest*

**Caroline JAIN-BEUGUEL et Christelle SIMON-COLIN**

'Elaboration de nanoparticules de poly(hydroxyalcanoates) pour l'encapsulation de molécules thérapeutiques.'

### Journée des Doctorants de l'ICMPE 2015

*10/12/15 à Thiais*

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Christelle SIMON-COLIN et Valérie LANGLOIS**

'Potentiels des poly(hydroxyalcanoates) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique.'

### Journée des Doctorants de l'ICMPE 2016

*08/12/16 à Thiais*

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Christelle SIMON-COLIN et Valérie LANGLOIS**

'Potentiels des poly(hydroxyalcanoates) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique.'

### 8<sup>ème</sup> Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne

*17.20/10/17 à Camaret*

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Valérie LANGLOIS et Christelle SIMON-COLIN**

'Production de poly(hydroxyalcanoates) à courtes chaînes à partir de bactéries marines : détection, production et valorisation.'

## Journée des Doctorants de l'ICMPE 2017

01/12/17 à Thiais

### **Premier prix de communication orale**

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Christelle SIMON-COLIN et Valérie LANGLOIS**

'Potentiels des poly(hydroxyalcanoates) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique.'

## COMMUNICATION PAR AFFICHE

### 1<sup>st</sup> International Symposium Drug Delivery and New Therapeutics

09.11/04/18 à Orsay

**Caroline JAIN-BEUGUEL, Valérie LANGLOIS et Christelle SIMON-COLIN**

'PHA-producing Bacteria from deep-sea environments: towards a new generation of therapeutics.'

## ENSEIGNEMENTS

Cours magistral (4 h) dispensé aux élèves de 2<sup>ème</sup> année du Master Chimie parcours Polymères fonctionnels de l'UPEC

18.19/12/17 à Thiais

'Potentiels des poly(hydroxyalcanoates) : détection, production et valorisation.'

## ENCADREMENT DE STAGIAIRES

Alizée LE FERRAND Master 1 - *janvier et février 2017*

Sujet : Production de P(3HB4HB) à partir de bactéries marines.

Jérémy LE JONCOUR Master 2 - *janvier à juin 2017*

Sujet : Recherche, caractérisation et production de P(3HB4HB) à partir de bactéries marines.

## VULGARISATION SCIENTIFIQUE

### 11<sup>ème</sup> édition de la Nuit Européenne des Chercheurs

30/09/16 à Brest

Présentation, animation et échanges avec le public sur le thème 'production de PHA à partir de micro-organismes hydrothermaux'.

**Titre :** Potentiels des Poly-HydroxyAlcanoates (PHA) bactériens pour l'encapsulation de molécules à visée thérapeutique.

**Mots clés :** PHA, fermentation, phylogénie, Metal-Organic Frameworks (MOF), nanoparticules hybrides

**Résumé :** Les Poly(HydroxyAlcanoates) (PHA) sont des polymères naturels, biodégradables et biocompatibles, synthétisés par de nombreux organismes, et plus particulièrement des procaryotes. Il existe à ce jour plus de 150 types de monomères de PHA différents, accumulés chez différents genres bactériens, en tant que source d'énergie et de carbone. En effet, les granules de PHA intracellulaires sont produits en réponse à un apport en excès de sources de carbone dans l'environnement (glucides, acides gras...), couplé à une carence en éléments azotés nécessaires à la division cellulaire. De par leur caractère biodégradable et biocompatible, les PHA sont employés depuis plus de 20 ans comme biomatériaux dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux, notamment comme micro/nanovecteurs à visée thérapeutique. Ce Doctorat met en évidence des méthodes de criblage moléculaire par PCR pour la sélection de bactéries productrices de PHA, isolées de sites hydrothermaux des océans Atlantique et Pacifique au cours de campagnes océanographiques Ifremer.

Selon des protocoles de fermentation standardisés et optimisés, des polymères de poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) P(3HB4HB) d'intérêt biomédical ont été produits, puis des études taxonomiques et phylogénétiques ont été menées pour explorer la biodiversité microbienne associée aux environnements marins profonds. Ensuite, des PHA ont été modifiés par réaction thiol-ène photoactivée afin d'obtenir des copolymères hydrosolubles, adaptés pour l'enrobage de nanoparticules poreuses de type Metal-Organic Frameworks (MOF). La caractérisation physico-chimique a été réalisée par différentes techniques, et notamment par SEM et STEM-EDX. Les systèmes hybrides poreux MOF-PHA ont ensuite été évalués quant à leur biocompatibilité vis-à-vis de cellules immunitaires (macrophages), par des tests de cytotoxicité et de prolifération cellulaire. Cette étude met en lumière les potentialités de cette nouvelle génération de nanovecteurs, synthétisés pour augmenter le bénéfice thérapeutique tout en minimisant les effets secondaires sur l'organisme humain.

**Title :** Potentials of bacterial Poly-HydroxyAlcanoates (PHA) for the encapsulation of therapeutic molecules.

**Keywords :** PHA, fermentation, phylogeny, Metal-Organic Frameworks (MOF), hybrid nanoparticles

**Abstract :** Poly(HydroxyAlcanoates) (PHA) are natural polymers, biodegradable and biocompatible, synthesized by many organisms, especially prokaryotes. There are over 150 kinds of these polyesters, accumulated in a wide variety of bacteria as carbon and energy storage material. PHA granules are deposited intracellularly when microorganisms are cultivated in the presence of an excess of carbon source (glucids, fatty acids...) together with a nitrogenous nutrient deficiency. Due to their biodegradability and biocompatibility, PHA can be used as biomaterials in medical or pharmaceutical fields, and numerous therapeutic micro/nanovectors have already been developed over the past two decades. The present PhD research project highlighted molecular screening methods by PCR for the PHA-producing Bacteria selection, isolated during Ifremer cruises from hydrothermal vents in Atlantic and Pacific oceans.

According to standardized and optimized fermentation protocols, poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) P(3HB4HB) polymers of biomedical interest were produced, then taxonomic and phylogenetic studies were performed to explore microbial biodiversity associated with deep-sea environments. Next, PHA were modified by 'click chemistry' to obtain hydrosoluble copolymers, suitable for coating high porous Metal-Organic Frameworks (MOF) therapeutic nanoparticles. Physico-chemical characterization was performed using different techniques, and more particularly by SEM and STEM-EDX. MOF-PHA hybrid porous systems were then evaluated for their biocompatibility against immune cells (macrophages), by cytotoxicity and cellular proliferation tests. This study highlights potentials of these new generations of nanovectors, synthesized to increase the therapeutic benefit while minimizing side effects on the human body.