

---

Université Lille 1

Sciences et Technologies

# Thèse

Présentée par François COUTTE

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Lille 1 Sciences et Technologies  
Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

---

## PRODUCTION SELECTIVE DE LIPOPEPTIDES PAR *BACILLUS* *SUBTILIS* EN BIOREACTEUR A MEMBRANE

DU GENIE MOLECULAIRE AU GENIE DES PROCEDES

---

Préparée au Laboratoire ProBioGEM, UPRES-EA 1026

Soutenue le 25 Septembre 2009 devant le Jury composé de :

Philippe JACQUES, Professeur	(Université Lille 1 Sciences et Technologies, France)	Directeur
Pascal DHULSTER, Professeur	(Université Lille 1 Sciences et Technologies, France)	Directeur
Gérard GOMA, Professeur	(Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, France)	Rapporteur
Bernard JORIS, Professeur	(Université de Liège, Belgique)	Rapporteur
Stéphane AYMERICH, Directeur de Recherche	(INRA, CNRS, AGROPARITECH, Thiverval Grignon, France)	Président
Valérie LECLERE, Maître de Conférences	(Université Lille 1 Sciences et Technologies, France)	Examinatrice
Marc ONGENA, Chercheur qualifié FNRS	(Faculté Universitaire Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique)	Examineur
Didier LECOUTURIER, Maître de Conférences	(Université Lille 1 Sciences et Technologies, France)	Examineur

---

« Ne crois pas que tu t'es trompé de route,  
quand tu n'es pas allé assez loin »

Claude Aveline

Tous droits réservés

---

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance envers Messieurs les Professeurs Pascal DHULSTER et Philippe JACQUES, directeur et co-directeur du laboratoire ProBioGEM, qui ont assuré la co-direction et le suivi de ma thèse. Je les remercie pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont apportés tout au long de ces quatre années de recherche. Leurs compétences scientifiques et leur grande disponibilité m'ont permis de mener ce travail dans d'excellentes conditions.

Je remercie vivement l'ensemble du jury qui a bien voulu juger ce travail. Je remercie tout d'abord Messieurs les Professeurs Gérard GOMA et Bernard JORIS qui m'ont fait l'honneur d'évaluer et de corriger ce manuscrit. Merci à M. le Directeur de Recherche Stéphane AYMERICH d'avoir accepté d'être examinateur de la thèse. Merci également aux Docteurs Marc ONGENA, Valérie LECLERE et Didier LECOUTURIER d'avoir accepté de participer au jury d'évaluation de mon travail.

Cette thèse n'aurait pas été possible d'ailleurs sans le remarquable soutien et la grande disponibilité des Drs. Valérie LECLERE, Didier LECOUTURIER et Max BECHET (IR), qui m'ont encadré durant mes recherches. Je tiens à leur exprimer ma reconnaissance aussi pour tous les conseils, les encouragements et toutes les pierres qu'ils ont su apporter à mon édifice. J'ai une pensée particulière pour le Dr. Didier LECOUTURIER qui m'a accompagné durant toutes ces nuits de labeur passées au laboratoire pour conduire les nombreux bioprocédés fermentaires de *Bacillus subtilis*.

J'adresse ma profonde gratitude au Pr. Didier GUILLOCHON, directeur du laboratoire ProBioGEM au début de ma thèse et directeur de recherche durant mon DEA, pour la confiance qu'il m'a accordé et son soutien tout au long de mes recherches.

J'accorde une attention particulière au Dr. Jean Sébastien GUEZ (IR), responsable de la plate-forme de fermentation du laboratoire pour sa collaboration et son aide durant la mise en œuvre des bioprocédés fermentaires, lors de mes travaux de transcriptomique ainsi que dans la rédaction de ce manuscrit. Mais je n'oublie pas non plus Laurent BONNEAU, technicien au laboratoire ProBioGEM et à Polytech'Lille pour avoir su toujours satisfaire à mes nombreuses demandes d'aide, de matériels ou de réactifs, et pour avoir supporté pendant quatre ans la réplique « Laurent tu peux me lancer l'autoclave ? » ou « me prêter ce matériel ? ». Pour les mêmes raisons je remercie les techniciens de Polytech'Lille Rattana SY et François LENO.

Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré à ces recherches, je pense plus particulièrement au Pr. Pierre-Marie DANZE et à Anne-Sophie DRUCBERT de la plate-forme de génomique fonctionnelle de l'Université de Lille 2 pour leur contribution dans les analyses transcriptomiques. Au Dr. Sylvain THUAUDET de la société MEDOS pour sa collaboration, au Dr. Bernard WATHELET de l'Université des Sciences Agronomiques de Gembloux pour les analyses de spectrométrie de masse, au Pr. Bernard JORIS de l'Université de Liège pour les expériences d'interruption de la sporulation.

---

L'occasion m'est donnée pour remercier à mon tour les stagiaires que j'ai encadrés et qui ont participé bénévolement à l'avancée de mes travaux, plus particulièrement Marouf OULD HAMED, Estelle HAMON et Thibaud OURY pour leurs apports dans les constructions génétiques, ainsi que Daniela ROTAR et Jonathan COLLART pour leur participation dans la mise en œuvre des bioprocédés fermentaires.

Un grand merci à tous les membres du Laboratoire ProBioGEM, avec une pensée plus particulière pour le Dr. Rozenn RAVALLEC, le Dr. Renato FROIDEVAUX et le Pr. Dominique VERCAIGNE-MARKO pour leur soutien amical et Cathy OUBLION, secrétaire du laboratoire pour son aide infaillible dans les travaux administratifs, ainsi que la fine équipe du ProBioGEM's Laboratory : Lucie, Estelle, Arthur, Mathieu, Aurélien et Omar, auxquels j'associe les sites massivemusicquiz.com et ninjakiwi.com, pour les moments de détente partagés. Un grand merci à Lucie pour son aide de dernière minute et pour ses compétences informatiques sans failles.

Je n'oublie pas non plus les anciens du LTSN qui m'ont vu débiter et qui m'ont soutenu : Romain, Loredana, Céline. Par la même occasion je voudrai saluer Khalil, cet homme au-dessus de tous soupçons, et mes compères de la belote scientifique qui ont déjà été cités plus haut auxquels je n'oublie pas de rajouter El señor Aldo.

J'exprime ma chaleureuse reconnaissance au Dr. Gabrielle BILLON, au Dr. François KRIER, au Dr. Krasimir DIMITROV et au Dr. Karim KRIAA, pour la sympathie qu'ils m'ont accordée et le plaisir partagé d'avoir enseigné avec eux pendant les 600 heures de travaux pratiques effectués au cours de ces années. A ce titre j'ai une pensée plus particulière pour le Pr. Pascal DHULSTER qui m'a permis d'effectuer ces enseignements, pour le Dr. Anne FERTIN qui m'a toujours témoigné sa sympathie et son soutien et pour les mêmes raisons Bertrand FERTIN (IE) ainsi que pour toute son aide apportée lors de mes enseignements et de mes travaux en génie des procédés.

Enfin j'exprime mes plus profonds remerciements à ma famille et surtout à mes parents qui m'ont toujours soutenu pendant les moments difficiles et à ma fiancée pour avoir eu la gentillesse et surtout le courage de lire, de relire et de corriger ce manuscrit. Merci aussi à mon frère pour m'avoir prêté sans presque pas rechigner son ordinateur quand le mien m'a laissé tomber de nombreuses fois en pleine rédaction. Cette thèse n'aurait pas été possible sans eux non plus. J'aimerai faire une dédicace à ma marraine qui m'a initié très jeune à la biologie et à la microbiologie. Je n'oublie pas non plus mes amis, qui, grâce à leur présence et leur soutien m'ont permis de toujours garder le moral et la persévérance. Je les remercie aussi d'avoir perdu mon numéro de téléphone pendant les mois de rédaction de ce manuscrit.

---

## RESUME

*Bacillus subtilis* produit grâce à un mécanisme non-ribosomique trois types de lipopeptides, possédant de nombreuses activités biologiques : les iturines, les surfactines et les fengycines ou plipastatines. La synthèse de ces molécules est le plus souvent soumise à une régulation complexe. Par ailleurs, leurs propriétés tensioactives rendent la production de ces lipopeptides en bioréacteur aéré difficile à cause d'une formation massive de mousse, empêchant leur production à grande échelle.

Les travaux effectués reposent sur deux approches pour l'optimisation de la production des lipopeptides de *B. subtilis*. D'un côté, la mise au point d'un procédé innovant, basé sur la technologie du bioréacteur à contacteur à membrane air/liquide (bioréacteur sans bulles), pour la production de lipopeptides sans la formation de mousse. Les performances de ce bioréacteur à membrane, ont permis par la suite l'élaboration d'un procédé intégré multi membranaire pour la production, l'extraction et la purification en continu des lipopeptides de *B. subtilis*. D'un autre côté, une optimisation génétique de la production de surfactine a été entreprise pour se libérer de la régulation complexe de la synthèse de ce lipopeptide et obtenir une souche, dérivée de *B. subtilis* 168, uniquement productrice de surfactine, BBG131. Les différents mutants obtenus dans le cadre de cette optimisation génétique ont également permis de démontrer le caractère soit synergique soit antagoniste de la co-production de la surfactine et de la plipastatine sur les propriétés biologiques de *B. subtilis*. Par ailleurs, l'exploitation du mutant BBG131 dans le procédé intégré mis au point précédemment a permis la production, l'extraction et la purification de plusieurs dizaines de grammes de surfactine, laissant entrevoir la faisabilité de ce procédé intégré à l'échelle industrielle.

## ABSTRACT

*Bacillus subtilis* produces up to three families of lipopeptides through a non-ribosomal mechanism, i.e., iturins, surfactins and fengycins or plipastatins. These molecules show a broad range of biological properties. Their biosynthesis is most often subject to complex regulation. In addition, the surface properties of these molecules make the production of the lipopeptide in an aerated bioreactor difficult because of the foaming, rendering difficult their large-scale production.

This work was based on two approaches to optimize the production of the lipopeptide. On the one hand, an innovative process based on the technology of membrane bioreactor was developed for the production of lipopeptide to circumvent the massive foaming problem. For the first time, different bubbleless bioreactors were used for lipopeptide production by *B. subtilis* using hollow fiber membranes as air-liquid contactor. The performance of this bubbleless bioreactor enabled us to conduct a study of the lipopeptide production in a bubbleless bioreactor coupled with a continuous lipopeptide membrane extraction. On the other hand, a genetic optimization of the production of surfactin was undertaken to release its synthesis from a complex regulation and to obtain a single surfactin producer strain derived from *B. subtilis* 168, named BBG131. The different mutant strains obtained in this genetic optimisation process allow us to demonstrate some synergistic or antagonistic effect of surfactin and fengycin co-production on biological properties of *Bacillus subtilis*. Furthermore, the use of BBG131 in the integrated process previously developed led to the production, extraction and purification of several tens of grams of surfactin, pointing out the feasibility of this integrated process at the industrial scale.

---

## TABLES DES MATIERES

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Tables des matieres</b> .....	<b>6</b>
<b>Liste des abreviations</b> .....	<b>11</b>
<b>Avant propos</b> .....	<b>14</b>
<b>Chapitre I: INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>16</b>
1.1. Généralités sur <i>Bacillus subtilis</i> .....	16
1.2. La synthèse non ribosomique.....	17
1.2.2. L'organisation des synthétases .....	18
1.2.3. Rôle de la phosphopantéthéine transférase.....	21
1.2.4. La diversité des molécules issues de la synthèse non ribosomique.....	23
1.3. Le métabolisme du glucose et du glutamate chez <i>B. subtilis</i> .....	25
1.4. Les lipopeptides de <i>B. subtilis</i> .....	28
1.4.1. La surfactine .....	29
1.4.1.1. Mécanisme et régulation de la synthèse de la surfactine .....	30
1.4.1.1.1. Les voies qui régulent l'expression de l'opéron <i>srfA</i> .....	31
1.4.1.1.2. Les voies régulées par l'expression de l'opéron <i>srfA</i> .....	34
1.4.1.2. Les propriétés des surfactines .....	36
1.4.1.2.1. Propriétés tensioactives et moussantes .....	36
1.4.1.2.2. Propriétés biologiques.....	37
1.4.1.2.3. Activité hémolytique.....	37
1.4.2. Les fengycines ou les plipastatines.....	38
1.4.2.1. Mécanisme et régulation de la synthèse de la plipastatine .....	38
1.4.2.2. Les propriétés des plipastatines ou des fengycines.....	40
1.4.3. Domaines d'application potentielle des surfactines et des plipastatines .....	40
1.4.3.1. En agro-alimentaire et en agriculture.....	40
1.4.3.2. En pétrochimie.....	41
1.4.3.3. En environnement.....	41
1.4.3.4. En pharmaceutique et cosmétique .....	41
1.5. La production des lipopeptides de <i>B. subtilis</i> .....	42
1.5.1. Les milieux de culture utilisés .....	42
1.5.2. Les conditions de culture utilisées.....	42
1.5.3. La production des lipopeptides de <i>B. subtilis</i> en bioréacteur et ses contraintes.....	43
1.6. Les bioréacteurs à membrane.....	45
1.6.1. Rappels sur les bioréacteurs .....	45
1.6.2. Les bioréacteurs à membranes.....	47
1.6.2.1. Les membranes séparatives liquide/liquide .....	48
1.6.2.1.1. Utilisation pour le recyclage des cellules.....	48
1.6.2.1.2. Utilisation pour l'extraction des produits .....	51
1.6.2.2. Les contacteurs air/liquide à membrane : une solution pour la production des biosurfactants d'origine microbienne .....	52
1.7. L'extraction et la purification des lipopeptides de <i>B. subtilis</i> .....	54
<b>2. Situation et objectifs du travail</b> .....	<b>56</b>
<b>Chapitre II : MATERIELS et METHODES</b> .....	<b>58</b>
<b>1. Souches et plasmides utilisés</b> .....	<b>59</b>
<b>2. Les milieux de culture</b> .....	<b>63</b>
2.1. Le milieu de Landy .....	63

2.1.1.	Composition.....	63
2.1.2.	Solutions stocks.....	63
2.2.	Le milieu B.....	64
2.3.	Les milieux Sterlini-Mandelstam.....	65
2.4.	Les autres milieux de culture : LB, MSI, SOC.....	65
2.5.	Les marqueurs de sélection antibiotiques.....	67
<b>3.</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire.....</b>	<b>68</b>
3.1.	Extraction d'ADNg.....	68
3.2.	La Polymérase Chain Reaction (PCR).....	68
3.3.	Quantification des ARN totaux chez <i>B. subtilis</i> .....	69
3.3.1.	Le blocage du transcriptome.....	69
3.3.2.	L'extraction des ARN.....	70
3.3.3.	La transcription inverse.....	71
3.3.4.	La quantification de l'expression d'un gène.....	72
3.4.	L'extraction de plasmides.....	73
3.4.1.	Utilisation de la technique du « boiling ».....	73
3.4.2.	Utilisation de la Miniprep.....	73
3.5.	Enzymes et kit de purification.....	74
3.6.	Le clonage plasmidique.....	74
3.7.	Électrophorèse en gel d'agarose.....	75
3.8.	Les techniques de transformation.....	76
3.8.1.	Préparation des plasmides.....	76
3.8.2.	Préparation des cellules.....	77
3.8.3.	Transformation par choc thermique.....	77
3.8.4.	Transformation par compétence naturelle.....	78
3.8.5.	Transformation par électroporation.....	78
3.9.	La vérification des constructions génétiques.....	79
<b>4.</b>	<b>Stratégies d'optimisation moléculaire de la synthèse de surfactine chez <i>B. subtilis</i>. .....</b>	<b>80</b>
4.1.	Rétablissement de la synthèse de lipopeptides chez <i>B. subtilis</i> 168 (BBG111).....	81
4.2.	Comparaison de la force des promoteurs $P_{srfA}$ et $P_{repU}$ chez <i>B. subtilis</i> 168.....	82
4.2.1.	Construction de la souche BBG127.....	82
4.2.2.	Construction de la souche BBG128.....	82
4.3.	Remplacement du promoteur $P_{srfA}$ par le promoteur constitutif $P_{repU}$ chez <i>B. subtilis</i> 168 et BBG111 ..	83
4.3.1.	Construction des souches BBG118 et BBG113.....	83
4.3.2.	Construction des souches BBG118B et BBG113B.....	87
4.4.	Interruption de la synthèse de plipastatine chez les dérivés de <i>B. subtilis</i> 168 (BBG130, BBG131, BBG131B).....	89
4.5.	Interruption de l'operon <i>spoIIIA</i> , impliqué dans la sporulation chez les dérivés de <i>B. subtilis</i> 168 (BBG119 & BBG120).....	91
<b>5.</b>	<b>Cultures de <i>B. subtilis</i> en fioles d'Erlenmeyer.....</b>	<b>92</b>
5.1.	Préparation d'un soucier.....	92
5.2.	Préparation d'un inoculum.....	93
5.3.	Culture en fiole d'Erlenmeyer.....	93
<b>6.</b>	<b>Cultures de <i>B. subtilis</i> en bioréacteur.....</b>	<b>94</b>
6.1.	Cultures de <i>B. subtilis</i> en bioréacteur.....	94
6.2.	Culture de <i>B. subtilis</i> en bioréacteur à contacteur air/liquide à membrane.....	95
6.2.1.	Les contacteurs air/liquide à membrane externes.....	97
6.2.2.	Le contacteur air/liquide à membrane interne.....	98
6.2.3.	Le lavage et le stockage des contacteurs air/liquide à membrane.....	99
6.3.	Couplage d'un système d'extraction/concentration des lipopeptides à un bioréacteur à contacteur air/liquide à membrane.....	100
6.3.1.	Culture continue de <i>B. subtilis</i> en bioréacteur à contacteur air/liquide à membrane.....	101
6.3.2.	L'extraction des lipopeptides et le recyclage des cellules par microfiltration.....	103
6.3.3.	La concentration des lipopeptides par ultrafiltration.....	104
6.3.4.	Le lavage et le stockage des membranes de filtration.....	105
<b>7.</b>	<b>Purification des lipopeptides.....</b>	<b>105</b>

7.1.	Concentration des lipopeptides par ultrafiltration.....	105
7.2.	Purification des lipopeptides par diafiltration.....	106
7.3.	Concentration des lipopeptides par évaporation.....	106
7.4.	Lyophilisation des lipopeptides.....	107
<b>8.</b>	<b>Etudes de l'adsorption de la surfactine.....</b>	<b>107</b>
8.1.	Adsorption de la surfactine sur les contacteurs à membrane lors d'un contact air/liquide.....	108
8.2.	Adsorption de la surfactine sur une membrane extractrice liquide/liquide.....	109
<b>9.</b>	<b>Analyses.....</b>	<b>110</b>
9.1.	Mesure de l'activité $\beta$ -galactosidase.....	110
9.2.	Mesure de la sporulation.....	111
9.3.	Mesure de la biomasse.....	111
9.4.	Purification et quantification des lipopeptides.....	112
9.4.1.	Sonication des cellules.....	112
9.4.2.	Purification des lipopeptides.....	112
9.4.3.	Analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	113
9.4.4.	Chromatographie sur couche mince.....	113
9.5.	Dosage du glucose, du glutamate et des acides organiques par CLHP.....	114
9.6.	Analyse des lipopeptides par spectrométrie de masse.....	114
9.7.	Mesure du débit standard en eau des membranes de filtration.....	115
9.8.	Analyse des gaz et mesure du $K_{La}$ .....	115
<b>10.</b>	<b>Tests d'activités biologiques.....</b>	<b>117</b>
10.1.	Activité $\alpha$ -Amylase.....	117
10.2.	Activité hémolytique.....	117
10.3.	Capacités de colonisation.....	117
10.4.	Activités antibactériennes.....	118
10.5.	Activités antifongiques.....	119
<b>Chapitre III : RESULTATS et DISCUSSION.....</b>		<b>120</b>
<b>1.</b>	<b>Mise en œuvre d'un bioreacteur aéré par un contacteur air/liquide à membrane.....</b>	<b>121</b>
1.1.	Introduction.....	121
1.2.	Culture batch de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en bioréacteur aéré par un contacteur air/liquide à membrane.....	122
1.2.1.	Croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en milieu de Landy.....	123
1.2.2.	Production de lipopeptides.....	126
1.2.3.	Données physiologiques de la culture.....	130
1.2.4.	Etude de l'évolution du coefficient de transfert d'oxygène.....	131
1.3.	Discussion.....	132
1.4.	Valorisation des résultats.....	135
1.4.1.	Publication.....	136
1.4.2.	Communications affichées.....	136
1.4.3.	Communications orales.....	136
<b>2.</b>	<b>Etude de l'adsorption de la surfactine à l'interface d'une membrane en fibres creuses 138</b>	
2.1.	Introduction.....	138
2.2.	Etude de l'adsorption de la surfactine sur un contacteur à membrane en fibres creuses lors d'un contact air/liquide.....	138
2.2.1.	Cinétique d'adsorption de la surfactine.....	139
2.2.2.	Influence de l'adsorption de la surfactine sur le $K_{La}$ .....	141
2.3.	Paramètres influençant l'adsorption de la surfactine sur un contacteur à membrane en fibres creuses lors d'un contact air/liquide.....	142
2.4.	Etude de l'adsorption de la surfactine sur une membrane de microfiltration d'extraction liquide/liquide.....	144
2.5.	Discussion.....	147
<b>3.</b>	<b>Mise en œuvre d'un procede integre de production, d'extraction et de concentration de la fengycine produite par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....</b>	<b>149</b>
3.1.	Introduction.....	149
3.2.	Production et extraction en continu de fengycine et de surfactine produite par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	149

3.2.1.	Analyse de l'effet du taux de dilution sur la physiologie de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	150
3.2.1.1.	Analyse de la croissance en milieu de Landy.....	150
3.2.1.2.	Production en continu des lipopeptides.....	151
3.2.1.3.	Dosage des substrats et des métabolites primaires.....	152
3.2.1.4.	Influence du taux de dilution ou d'oxygénation sur la productivité.....	154
3.2.1.5.	Analyse de l'effet du taux de transfert d'oxygène sur la physiologie de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	156
3.2.2.	Extraction et concentration en continu des lipopetides.....	157
3.3.	Etude du colmatage des membranes.....	158
3.3.1.	Lavage des membranes.....	158
3.3.2.	Evolution du $K_{La}$ .....	159
3.3.3.	Débit standard en eau des membranes de filtration.....	159
3.4.	Discussion.....	160
<b>4.</b>	<b>Obtention d'une souche monoproductrice de surfactine par optimisation génétique de <i>B. subtilis</i> 168.....</b>	<b>162</b>
4.1.	Modifications génétiques de <i>B. subtilis</i> 168.....	163
4.1.1.	Introduction.....	163
4.1.2.	Rétablissement de la synthèse de lipopeptides chez <i>B. subtilis</i> 168.....	163
4.1.3.	Comparaison de la puissance des promoteurs $P_{srfA}$ et $P_{repU}$ chez <i>B. subtilis</i> 168.....	165
4.1.4.	Remplacement du promoteur $P_{srfA}$ par le promoteur constitutif $P_{repU}$ chez <i>B. subtilis</i> 168 et BBG111.....	167
4.1.5.	Interruption du gène <i>ppsA</i> codant pour la synthèse de plipastatine chez les dérivés de <i>B. subtilis</i> 168.....	169
4.1.6.	Interruption du gène <i>spoIIIA</i> , impliqué dans la sporulation chez les dérivés de <i>B. subtilis</i> .....	170
4.2.	Propriétés phénotypiques et activités biologiques des dérivés de <i>B. subtilis</i> 168 sur milieu solide.....	172
4.2.1.	Introduction.....	172
4.2.2.	Activités hémolytiques.....	172
4.2.3.	Croissance invasive.....	174
4.2.4.	Activités antifongiques et antibactériennes.....	175
4.3.	Production de lipopeptides et comportement des dérivés de <i>B. subtilis</i> 168 en milieu liquide.....	177
4.3.1.	Introduction.....	177
4.3.2.	La croissance en milieu liquide.....	177
4.3.3.	La production de lipopeptides en milieu liquide.....	179
4.4.	Influence de l'expression constitutive de <i>srfA</i> chez BBG113B sur la sporulation de la souche.....	183
4.5.	Conclusion.....	184
4.6.	Analyse de l'expression des gènes dépendants de la transcription de l'opéron <i>srfA</i> .....	185
4.6.1.	Introduction.....	185
4.6.2.	Analyse par PCR quantitative des gènes régulés par l'expression constitutive de l'opéron <i>srfA</i> .....	185
4.7.	Discussion.....	187
4.8.	Valorisation des résultats.....	191
4.8.1.	Publications.....	191
4.8.2.	Communications orales.....	192
4.8.3.	Communications affichées.....	192
<b>5.</b>	<b>Production en continu de la surfactine par <i>B. subtilis</i> BBG131 dans un bioréacteur à membrane.....</b>	<b>193</b>
5.1.	Introduction.....	193
5.2.	Etude préliminaire de la production de surfactine en fiole.....	193
5.3.	Production et extraction en continu de surfactine produite par <i>B. subtilis</i> BBG131.....	194
5.3.1.	Effet du taux de dilution sur la croissance continue de <i>B. subtilis</i> BBG131 en milieu de Landy.....	195
5.3.2.	Effet du taux de dilution sur la production et l'extraction en continu de la surfactine.....	197
5.3.3.	Données physiologiques de la culture.....	199
5.3.3.1.	Etude métabolique.....	199
5.3.3.2.	Analyse de la consommation en titrants.....	201
5.3.3.3.	Analyse de la consommation d'O <sub>2</sub> et de la production de CO <sub>2</sub> .....	202
5.3.4.	Influence du taux de dilution sur la productivité.....	203
5.4.	Etude du colmatage des membranes.....	204

---

5.4.1.	Lavages des membranes .....	204
5.4.2.	Evolution du $K_{La}$ .....	205
5.4.3.	Débit standard en eau des membranes de filtration .....	205
5.5.	Discussion .....	206
<b>6.</b>	<b>Purification des lipopeptides de <i>B. subtilis</i> .....</b>	<b>209</b>
6.1.	Introduction .....	209
6.2.	Purification par ultrafiltration et diafiltration .....	210
6.3.	Lyophilisation des lipopeptides .....	211
6.4.	Solubilisation et verification de la pureté des produits .....	211
6.5.	Discussion .....	213
<b>Chapitre IV : CONCLUSION et PERSPECTIVES.....</b>		<b>214</b>
<b>Liste des références .....</b>		<b>220</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>236</b>
<b>ANNEXE I.....</b>		<b>237</b>
<b>ANNEXE II .....</b>		<b>238</b>
<b>ANNEXE III.....</b>		<b>239</b>

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

### Microorganismes :

<i>B. subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. oxysporum</i> :	<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>M. luteus</i> :	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

### Divers:

ATB :	Antibiotique
PM :	Marqueur de poids moléculaire
CMC :	Concentration Micellaire Critique
NRPS :	“Non Ribosomal Peptide Synthetase”
PKS :	“Polyketide synthase”
AMT :	Aminotransférase
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ARNtot :	Acides ribonucléiques totaux
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
ADP :	Adénosine diphosphate
dNTP:	Désoxynucléotide triphosphate
ORF:	«Open Reading Frame» (Cadre de lecture ouvert)
RBS:	«Ribosome Binding Site» (Site de fixation au ribosome)
L- :	Lévogyre
D- :	Dextrogyre
Glc :	Glucose
Ile :	Isoleucine
Val :	Valine
Leu :	Leucine

---

Thr :	Thréonine
A-Thr :	Allo-thréonine
Glu :	Acide glutamique
Gln :	Glutamine
Asp :	Aspartate
Asn :	Asparagine
G6P :	Glucose-6-Phosphate
F6P :	Fructose-6-Phosphate
PEP :	Phosphoénolpyruvate
DHAP :	Dihydroxyacétone-phosphate
GA3P :	Glycéraldéhyde-3-phosphate
NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
FAD :	Flavine Adénine Dinucléotide
FADH <sub>2</sub>	Flavine Adénine Dinucléotide réduite
Taq Pol :	ADN-polymérase thermorésistante de <i>Thermophilus aquaticus</i>
PP :	Polypropylène
PES :	Polyéthersulfone

#### Méthodes :

CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
MF :	Microfiltration
UF :	Ultrafiltration
BB :	«Bubbleless Bioreactor» (Bioréacteur sans bulles)
MWCO :	«Molecular Weight Cut-Off» (Seuil de coupure)
M.S. :	Matière sèche

#### Principaux produits Chimiques :

EDTA :	Ethylène diamine tétra-acétate
MOPS :	Acide 3-[N-morpholino]-propane sulfonique
PIPES :	Acide pipérazine-1,4-bis (éthane-2 sulfonique)
ODS :	Octadecyl silica
TFA :	Acide trifluoroacétique

---

DTT :	Dithiothréitol
X-Gal:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -galactopyranoside
BET:	Bromure d'éthidium
TBE:	Tris-borate-EDTA
IPTG :	Isopropyl - $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
HEPES :	Acide 1-piperazineéthane, (2-hydroxyéthyl 4-sulfonique)- sel monosodique

Unités :

Da :	Dalton
DO :	Unité de Densité Optique
h :	heure
min :	minute
s :	seconde
m :	mètre
cm :	centimètre
mm :	millimètre
$\mu$ m :	micromètre
nm :	nanomètre
mL :	millilitre
$\mu$ L :	microlitre
M :	mole/L
mM :	millimole/L
nM :	nanomole/L
pM :	picomole/L
v/v :	volume/volume
pH :	potentiel hydrogène
tpm :	tour par minute
UFC :	unité formant colonie
vvm :	volume d'air par volume de milieu de culture par minute

## AVANT PROPOS

Les efforts en matière de protection de l'environnement n'ont cessé de s'intensifier depuis la fin du vingtième siècle, recherchant de plus en plus de produits d'origine biologique en remplacement des produits issus de la synthèse chimique et plus particulièrement ceux issus du pétrole. C'est notamment le cas pour les surfactants, produits tensioactifs, qui sont très utilisés dans un grand nombre d'applications industrielles. Ces molécules sont souvent issues de l'industrie chimique et fabriquées à partir de dérivés du pétrole mais, depuis quelques décennies, les efforts se sont portés sur des molécules d'origine biologique.

Il existe de nombreux tensioactifs d'origine biologique et particulièrement d'origine microbienne. L'un des plus puissants tensioactifs d'entre eux est la surfactine ; elle est produite avec d'autres molécules lipopeptidiques tensioactives par *Bacillus* sp. Par ailleurs ces lipopeptides, en plus d'être tensioactifs, possèdent de nombreuses activités biologiques d'intérêt. Cependant leur production à grande échelle est rendue difficile à cause de la régulation complexe de leur mécanisme de synthèse et de leurs fortes propriétés tensioactives.

Ces deux dernières contraintes ont été à la base de ce travail consacré à l'optimisation de la production sélective de fengycine et de surfactine en bioréacteur par *Bacillus subtilis*. Pour ce faire, les possibilités qu'offrent le génie génétique mais aussi le génie des procédés ont été exploitées, afin d'augmenter et/ou de faciliter la production, l'extraction et la purification de ces molécules. Un nouveau procédé de production innovant reposant sur les techniques du bioréacteur à membrane a été développé. Ce procédé permet de produire sans mousse les lipopeptides de *B. subtilis* afin de pouvoir les extraire en continu par des procédés membranaires intégrés. Par ailleurs, une optimisation génétique de la souche de *B. subtilis* 168, a permis d'obtenir une souche ne produisant constitutivement que la surfactine.

Le chapitre introductif a pour objectif dans un premier temps de décrire l'étendue actuelle des connaissances sur les mécanismes de synthèse des lipopeptides de *B. subtilis* et leurs mécanismes de régulation. Ensuite les procédés connus pour la production des lipopeptides de *B. subtilis*, et notamment les contraintes rencontrées lors de la production de surfactine en bioréacteur microbien seront détaillés. Dès lors des solutions innovantes potentielles seront proposées. Il ne s'agira pas d'être exhaustif mais d'essayer d'apporter une solution efficace afin de pouvoir produire, extraire et purifier en continu les lipopeptides de *B. subtilis*.

---

# **CHAPITRE I: INTRODUCTION**

## 1. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1. GÉNÉRALITÉS SUR *BACILLUS SUBTILIS*.

*Bacillus subtilis* appartient à la famille des *Bacillaceae*. Comme son embranchement l'indique (Firmicutes), c'est une bactérie à gram<sup>+</sup>, elle est considérée en microbiologie comme un organisme modèle. De morphologie bacilliforme, les cellules sont rectilignes avec des extrémités carrées ou arrondies. Leur longueur varie de 2 à 10 µm et leur largeur de 0,5 à 2 µm (Fig. 1, page 17). *B. subtilis* est catalase positive, aérobie ou aéro-anaérobie, c'est une bactérie que l'on trouve habituellement dans le sol, mais c'est surtout une espèce ubiquitaire. On la retrouve aussi dans l'eau de mer, l'eau douce ou dans les aliments. En général, une ciliature pétriche lui permet d'être mobile (système de flagelles qui recouvre tous les côtés de la bactérie). Sa température optimale de croissance est proche de 37°C (espèce mésophile) et elle est chimiohétérotrophe. Dans un environnement défavorable, chaque cellule végétative est capable de former une spore qui lui permet de survivre dans des conditions extrêmes. *B. subtilis* n'est pas considérée comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer les aliments et exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire. En revanche d'autres espèces de *Bacillus* sont très pathogènes, c'est le cas de certaines souches de *Bacillus cereus* et *Bacillus anthracis*.

La compétence naturelle de *B. subtilis*, qui peut être plus ou moins exprimée en fonction des souches, en fait un des outils génétiques les plus aisément manipulables avec *Escherichia coli* et les levures. Son étude approfondie comme modèle des bactéries gram<sup>+</sup> a permis d'établir les bases de la régulation cellulaire et des grandes voies du métabolisme général.

Un grand tournant fondamental a été réalisé avec le séquençage total de son génome, achevé en 1997 (Kunst *et al.*, 1997) et révisé récemment (Zeigler *et al.*, 2008). Celui-ci a permis de mettre en place de nouvelles approches expérimentales dites globales comme par exemple la transcriptomique et l'analyse des 4200 gènes contenus de son génome. Ce fut aussi la clef de voûte de nombreuses stratégies de biologie moléculaire visant à modifier les propriétés génétiques et physiologiques des souches de *B. subtilis*.

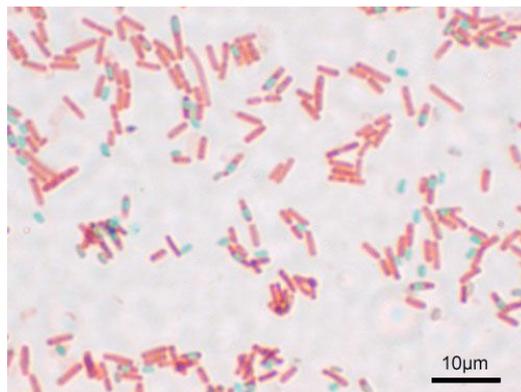


Fig. 1 Photographie au microscope optique de cellules végétatives (rouge) et de spores (vert) de *B. subtilis*.  
Les spores sont colorées au vert de malachite  
([http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacillus\\_subtilis\\_Spore.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacillus_subtilis_Spore.jpg)).

Sa capacité à croître rapidement, à atteindre de hautes densités cellulaires et à excréter un grand nombre de molécules en a fait un outil suscitant l'intérêt des industries agro-alimentaires et sanitaires pour ses enzymes et des industries pharmaceutiques et cosmétiques pour ses molécules à large spectre d'activité biologique, comme certains antibiotiques. Elle est aussi capable de produire des molécules peptidiques par un mécanisme défiant le dogme de la synthèse ribosomique, à savoir une synthèse de peptide non ribosomique.

## 1.2. LA SYNTHÈSE NON RIBOSOMIQUE

Selon un dogme bien ancré de la biologie cellulaire, la synthèse des protéines s'effectue via la transcription des gènes en ARN ensuite traduits en protéines. Pourtant, certains microorganismes comme les champignons et les bactéries font parfois appel à une seconde voie, par exemple pour synthétiser des antibiotiques peptidiques. À la fin des années cinquante (soit trente ans après la découverte de la pénicilline), personne ne pouvait imaginer que le mécanisme mis en œuvre s'affranchisse des règles de la synthèse ribosomique formulée des décennies précédentes notamment par le biologiste américain Joshua Lederberg, prix Nobel de médecine en 1958.

C'est au cours des années soixante que se dessine cette seconde possibilité, à partir de recherches menées sur la gramicidine S. Elles montrent qu'une fois traités avec une enzyme détruisant l'ARN, ou en présence d'une substance abolissant toute synthèse ribosomique, les extraits cellulaires de la bactérie produisant la gramicidine S sont toujours capables de synthétiser cette dernière (Tomino *et al.*, 1967).

Ces découvertes incitent le biochimiste Fritz Lipmann et ses collègues (Gevers *et al.*, 1968), spécialistes de la synthèse ribosomique, à s'intéresser au phénomène. Ils isolent alors deux des enzymes suspectées d'intervenir dans la formation de l'antibiotique et, poursuivant leurs investigations, montrent que ce sont bien elles qui orchestrent la fabrication du peptide. Ce type d'enzyme répond aujourd'hui au nom de peptide synthétase non ribosomique ou NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthetase, selon l'appellation anglo-saxonne). Le mode de synthèse de ces peptides est aujourd'hui bien connu, notamment grâce à l'amélioration des outils de biologie moléculaire.

Presque vingt années se sont écoulées entre l'identification des premières NRPS par Lipmann et le premier séquençage du gène codant l'une de ces enzymes : c'est en 1988 que l'équipe de Mohammed Marahiel a publié la séquence d'un gène codant pour une NRPS, en l'occurrence la tyrocidine synthétase (Gevers *et al.*, 1968; Weckermann *et al.*, 1988). Au cours des années quatre-vingt-dix, les techniques de séquençage d'ADN devenues plus performantes, ont permis la découverte de nombreux autres gènes codant des NRPS.

#### 1.2.1. Le mécanisme de synthèse

Cette biosynthèse peptidique est réalisée à l'aide de complexes multienzymatiques appelés synthétases ou NRPS. Ces enzymes sont remarquables de par leur masse moléculaire puisqu'elles peuvent atteindre  $5.10^6$  Da, soit le double de celle d'un ribosome. Cette synthèse fait souvent appel à plusieurs NRPS codées par des gènes organisés en opéron ou en clusters. Ces gènes et les protéines qui en découlent ont eux-mêmes une organisation en modules. Un module est une section de la chaîne polypeptidique de la NRPS responsable de l'incorporation d'un acide aminé dans le peptide final (Keating et Walsh, 1999; Schwarzer *et al.*, 2003).

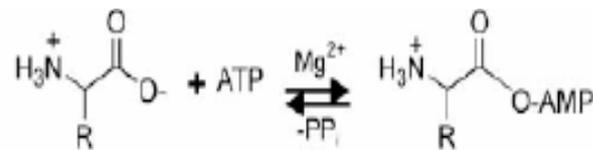
#### 1.2.2. L'organisation des synthétases

Pour être fonctionnelle, une synthétase doit posséder au moins 4 domaines, qui sont des unités enzymatiques qui catalysent une étape individuelle de la synthèse non-ribosomique du peptide. Ces domaines sont :

➤ Domaine d'adénylation (domaine A)

Ce domaine permet la reconnaissance plus ou moins sélective d'un acide aminé et son activation grâce à un ATP qui transforme l'acide aminé en amino acyl-AMP en présence de  $Mg^{2+}$  (von Dohren *et al.*, 1997; Smith, 2002).

L'énergie nécessaire à la réaction est fournie grâce à la libération d'un pyrophosphate de l'ATP selon la réaction ci-dessous :



➤ Domaine de thiolation (domaine T ou PCP pour Peptidyl Carrier Protein)

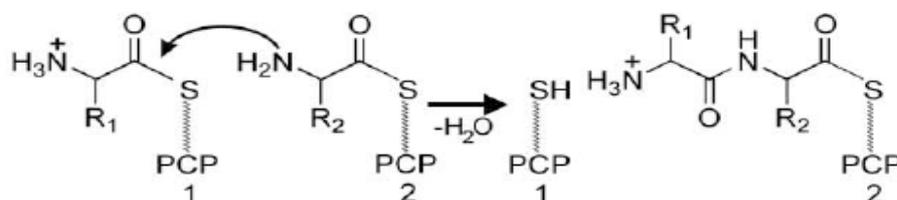
Le domaine de thiolation permet de lier de manière covalente l'acide aminé activé à la synthétase grâce à une réaction de thiolation entre cet acide aminé et le groupement phosphopantéthéine fixé au domaine T. Il est indispensable, pour que l'acide aminé puisse se fixer, que la phosphopantéthéine soit présente sur le domaine T. C'est le groupement thiol du groupement phosphopantéthéinyl qui permet à l'acide aminé de se lier de manière covalente au domaine PCP, selon la réaction ci-dessous :



➤ Domaine de condensation (domaine C)

La formation de la liaison peptidique entre 2 acides aminés est possible grâce à l'activité enzymatique du domaine de condensation (Schwarzer *et al.*, 2003). Ce domaine permet à l'acide aminé, lié sur le domaine T d'un module N, d'être transféré de celui-ci sur un nouvel acide aminé activé se trouvant sur le domaine T du module N+1 adjacent.

La réaction est du type addition électrophile, elle se déroule entre le groupement amine de l'acide aminé du module 2 (électrophile) avec le groupement carboxylique du module 1 (nucléophile) selon la réaction suivante (Keating et Walsh, 1999; Schwarzer *et al.*, 2003):



➤ Domaine de terminaison (domaine Te)

Celui-ci est l'ultime domaine du dernier module nécessaire à la biosynthèse non-ribosomique d'un peptide. Il effectue le clivage entre ce dernier et le module terminal.

Ce clivage peut se faire par hydrolyse s'il s'agit de la synthèse d'un peptide linéaire. Mais très souvent, il s'agit d'un processus de cyclisation (Samel *et al.*, 2006). Le domaine Te possède un résidu sérine particulier qui, grâce à une attaque nucléophile, accepte le transfert de la chaîne peptidique produite et liée au dernier domaine T. Ce transfert convertit la liaison thioester (liant le domaine T au peptide) en une liaison oxoester (liant le domaine TE au peptide) qui permettra le décrochage du peptide (Keating et Walsh, 1999), comme décrit dans la figure ci-dessous (Fig. 2, page 20):

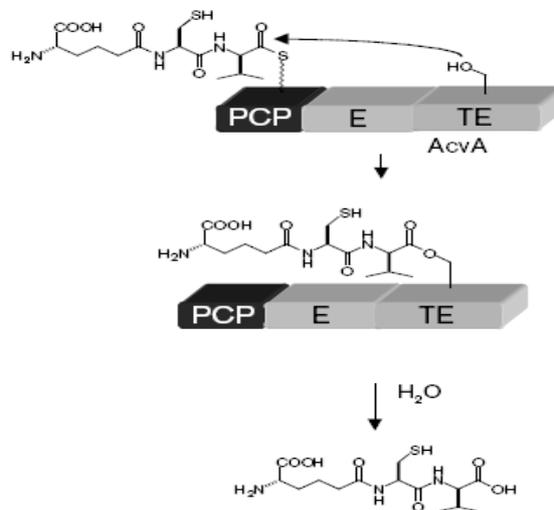


Fig. 2 Schéma récapitulatif de l'action du domaine de terminaison (Keating et Walsh, 1999)

Dans le schéma récapitulatif ci-dessous (Fig. 3, page 20), le module 1, composé seulement des domaines A et T, est dit module d'initiation. Le module 2, qui possède en plus le domaine de condensation, est appelé module d'élongation. Il existe également un module 3 dit de terminaison qui est composé de 4 domaines : C, A, T et Te (pour ThioEstérase) placé à la suite du domaine T (Keating et Walsh, 1999).

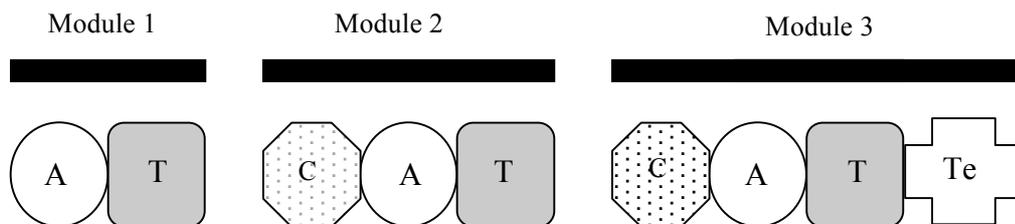
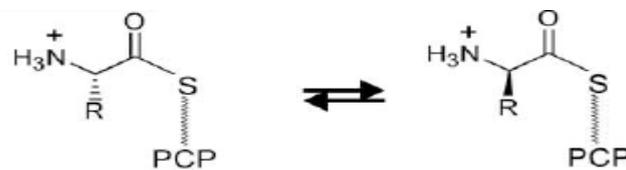


Fig. 3 Schéma récapitulatif de l'organisation des domaines au sein des différents modules

D'autres domaines, dits secondaires, peuvent également parfois être présents dans les modules. Ils vont permettre de modifier la structure des acides aminés incorporés dans le peptide et donc leurs propriétés. Ne seront expliqués ici que deux des domaines de modification les plus courants, à savoir le domaine d'épimérisation et le domaine de méthylation.

➤ Le domaine d'épimérisation (domaine E)

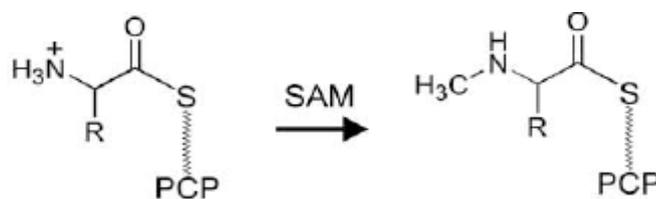
Ce domaine permet, de changer la configuration L d'un acide aminé (les acides aminés naturels) en une configuration D, comme décrit ci-dessous.



➤ Le domaine de méthylation

La méthylation de l'atome d'azote (N-méthylation) d'un acide aminé permet, entre autres choses, de protéger le peptide néo-synthétisé et ainsi de prévenir une rupture prématurée de celui-ci (Schwarzer *et al.*, 2003).

Il est activé grâce au cofacteur S-adenosylméthionine (Samel *et al.*, 2006) qui permet de transférer le groupe méthyl au niveau de l'acide aminé activé (Steller *et al.*, 2004) selon la réaction décrite ci-dessous (Schwarzer *et al.*, 2003). La N-méthylation a souvent lieu dans les peptides provenant des moisissures. Par exemple, la cyclosporine A contient 7 acides aminés méthylés sur les 11 qui la composent.



### 1.2.3. Rôle de la phosphopantéthéine transférase

Pour pouvoir effectuer la biosynthèse, un module doit se trouver sous sa forme « holoforme » c'est-à-dire la configuration sous laquelle les modules sont actifs (Keating et Walsh, 1999). Lorsque le module est sous forme inactive, les synthétases sont sous forme « apoforme ».

Les domaines T contiennent chacun un résidu sérine particulier. Une phosphopantéthéine transférase assure le transfert du groupement phosphopantéthéinique du coenzyme A sur le groupement hydroxyle du résidu sérine, ce qui permettra à la synthétase de devenir active en passant de la forme apo à la holo (Mootz *et al.*, 2001)(Fig. 4, page 22). Les domaines T présentent ainsi une extrémité -SH qui permettra la réaction de thiolation lors de l'élongation du peptide (Quadri *et al.*, 1998). C'est pourquoi la synthèse non ribosomique est aussi appelée « mécanisme de thiotemplate ».

Le groupement 4'-phosphopantéthéinique a 2 fonctions : premièrement, il permet une liaison covalente, donc relativement forte entre la synthétase et l'acide aminé, grâce à son groupement réactif thiol pour les étapes intermédiaires, et deuxièmement, la longueur et la flexibilité de cette molécule assistent le transfert des intermédiaires entre les différents modules du complexe (Marahiel *et al.*, 1997; Quadri *et al.*, 1998).

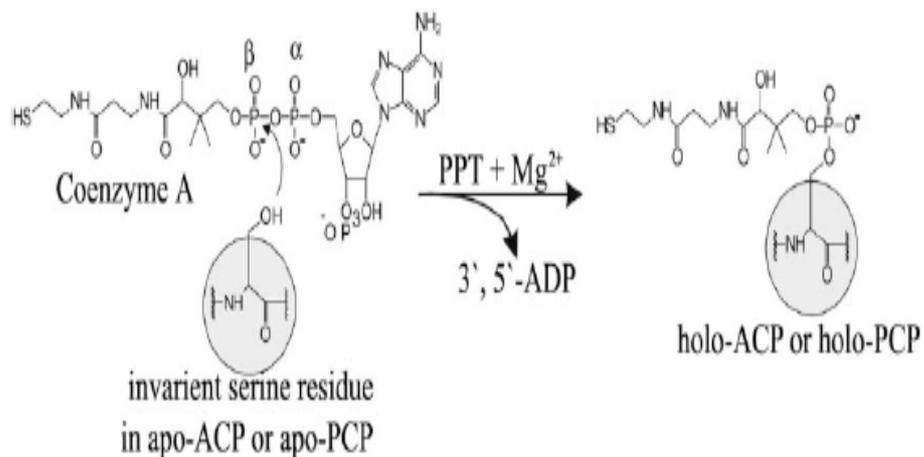


Fig. 4 Illustration de la réaction réalisée par la phosphopantéthéine transférase permettant le passage d'apoforme en holoforme (Copp et Neilan, 2006).

La phosphopantéthéine transférase (PTT), qui appartient à une superfamille d'enzymes essentielles pour la synthèse d'un grand nombre de composés, est codée chez *B. subtilis* par le gène *sfp*. Elle est composée d'environ 240 acides aminés (Mootz *et al.*, 2001; Copp et Neilan, 2006). Le gène *sfp*, situé 4 kb en amont de l'opéron *srfA*, a été identifié comme étant indispensable à la production de fengycine et de surfactine (von Dohren *et al.*, 1997).

Certaines souches *Sfp*<sup>-</sup> possèdent les opérons *fen* ou *pps* et *srfA* codant, respectivement, pour la fengycine et la surfactine synthétases, mais ne produisent aucun de ces 2 lipopeptides alors que leur séquence génomique est intacte. C'est le cas, par exemple, pour *B. subtilis* 168, qui est la souche de référence dont le génome a été complètement séquencé (Kunst *et al.*, 1997; Tsuge *et al.*, 1999). En réalité, *B. subtilis* 168 possède naturellement le gène *sfp* mais la séquence de ce dernier a subi une délétion, conduisant à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle (Zeigler *et al.*, 2008).

#### 1.2.4. La diversité des molécules issues de la synthèse non ribosomique

Il existe trois grands types de synthèse de peptide non ribosomique (Mootz *et al.*, 2002). Le type majoritaire est la biosynthèse linéaire où il y a colinéarité entre la synthétase et le peptide produit. Dans celle-ci l'enchaînement des modules au sein de la synthétase correspond à celui des monomères incorporés dans le peptide. Le second type est la biosynthèse itérative où certains modules de la synthétase sont utilisés plus d'une fois lors de la synthèse d'un même peptide. Le dernier type est la synthèse non linéaire où l'agencement des modules de la synthétase est différent de celui des monomères du peptide. Il faut aussi mentionner que, dans certains cas, des monomères qui ne sont pas issus de la synthèse NRPS peuvent être incorporés au sein du peptide. C'est le cas par exemple de monomères synthétisés par des domaines « polycétide synthase » ou PKS. Les polycétides sont dérivés de la polymérisation de sous-unités propionyles et acétyles dans un procédé similaire à la synthèse d'acides gras. La mycosubtiline synthétase présente cette originalité de rassembler les synthèses PKS et NRPS sur un même gène (Duitman *et al.*, 1999).

Ces différents types de biosynthèse non ribosomique combinés à des sources de monomères très diverses permettent à la cellule de s'affranchir des contraintes de sélection des acides aminés inhérentes à la synthèse ribosomique, et de produire des peptides aux particularités structurales sans égal. Les principales sources de monomères sont les 20 acides L-aminés protéogéniques mais il existe aussi des centaines d'autres composés aux structures remarquables tels que des acides gras, des résidus N- ou C-méthylés, des résidus N-formylés, des éléments hétérocycliques, des acides aminés glycosylés, des acides D-aminés ou des résidus phosphorylés (Sieber et Marahiel, 2005).

Par ailleurs, comme leur nom l'indique, les lipopeptides, et notamment ceux de *B. subtilis*, possèdent aussi une chaîne d'acide gras qui selon la molécule peut varier de longueur ou d'isomérisation. La prédominance des acides gras constitutifs branchés C-15 et C-17 fut montrée chez *B. subtilis* dès les années 60. Des études ont permis la découverte de trois autres acides gras branchés: *iC*-14, *iC*-16, et *aiC*-17 (Kaneda, 1967). De même que des analyses ont montré que les acides gras saturés *iso* et *anteiso* représentent 60 à 90% des acides gras totaux de *B. subtilis* (Bishop *et al.*, 1967). Les facteurs environnementaux peuvent affecter le profil des acides gras synthétisés chez *B. subtilis* et la proportion relative des différentes séries d'acides gras peut varier suivant l'espèce (Kaneda, 1967; Kaneda et Smith, 1980). L'ajout d'un certain nombre de substrats peut modifier les proportions d'acides gras dans la cellule (Kaneda, 1968). Ces différences dans les chaînes d'acides gras peuvent conférer des activités différentes aux molécules. Il a par exemple été montré récemment que la mycosubtiline *aiC17* avait le pouvoir antifongique le plus fort par rapport à d'autres monomères de cette molécule (Fickers *et al.*, 2009).

Cette diversité dans la synthèse permet l'obtention d'un large panel de structures particulières. Or, ce sont ces particularités structurales qui, le plus souvent, confèrent leur singulière activité biologique aux antibiotiques et aux autres peptides produits par les « peptide synthetases ». C'est le cas de la pénicilline, la céphalosporine (Byford *et al.*, 1997), la tyrocidine A (Marques *et al.*, 2007), la gramicidine S (Simakova *et al.*, 1985) et de la vancomycine (Caillon *et al.*, 1989) qui possèdent des activités antibiotiques antibactériennes. D'autres peuvent être immunosuppresseurs comme la cyclosporine A (Ryffel *et al.*, 1994) ou cytostatiques comme la bléomycine A2 (Muller *et al.*, 1983) et l'épothilone (Tang *et al.*, 2000). Il existe aussi de nombreux sidérophores (molécules permettant de chélater le fer) tels que la bacillibactine (May *et al.*, 2001), la yersiniabactine (Gehring *et al.*, 1998), la vibriobactine (Keating *et al.*, 2000) et les pyoverdines (Mossialos *et al.*, 2002). Enfin des propriétés tensioactives, antibactériennes et antifongiques peuvent être retrouvées chez les lipopeptides produits par *B. subtilis*. L'ensemble des peptides d'origine non ribosomique a été récemment rassemblé dans une banque de données appelée NORINE (<http://bioinfo.lifl.fr/norine>; Caboche *et al.*, 2008).

### 1.3. LE MÉTABOLISME DU GLUCOSE ET DU GLUTAMATE CHEZ *B. SUBTILIS*

Le glucose est une molécule énergétique importante et très largement utilisée chez tous les êtres vivants. Une fois assimilé par l'organisme, il est la principale source d'énergie et il contribue à la formation de nombreux métabolites primaires et secondaires. Les microorganismes utilisent plusieurs voies métaboliques pour dégrader le glucose et d'autres sucres. La glycolyse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphate sont les trois voies qui constituent le métabolisme central du carbone (Fig. 5, page 27). Dans le monde microbien, l'ossature du métabolisme central du carbone a fait l'objet de nombreuses études et est connue depuis les années 60. Depuis, ces voies métaboliques ont été très étudiées et notamment chez *B. subtilis* (Sonenshein *et al.*, 2002; Doan, 2003; Doan et Aymerich, 2003; Fuhrer *et al.*, 2004; Tannler *et al.*, 2008). Dans ce chapitre, l'accent sera mis sur les devenir possibles du glucose et de l'acide glutamique et sur les métabolites qui en dérivent. Ces deux derniers sont, comme nous le verrons par la suite, les deux principales sources énergétiques utilisées pour la culture de *B. subtilis*.

La première étape du métabolisme du glucose est la glycolyse ; le glucose rentre dans la cellule grâce au système phosphotransférase ou PTS, puis il est décomposé à l'issue de 9 réactions en pyruvate, selon la réaction globale suivante :



La voie des pentoses phosphate est couplée à la glycolyse. Elle se divise en deux parties (oxydative ou non oxydative) et est utilisée pour la conversion du glucose en fructose-6-phosphate (F6P) et en glycéraldéhyde-3-phosphate (GA3P), mais elle remplit aussi deux autres fonctions métaboliques importantes (Fig. 5, page 27). Une partie du glucose-6-phosphate (G6P) est engagée dans la production de nombreuses molécules dont essentiellement le ribose-5-phosphate, à la base de la biosynthèse de nucléotides, du NAD et d'acides aminés aromatiques. En outre, la voie des pentoses phosphates est impliquée dans la génération de pouvoir réducteur. De plus, la voie des pentoses phosphate est une voie d'utilisation d'autres sources carbonées (gluconate, ribose, xylose, etc...).

Bien que la glycolyse soit un processus pratiquement universel, la destinée de son produit final, le pyruvate, peut être différente selon les organismes et les conditions environnementales. Lorsque la production de pyruvate par la glycolyse excède les besoins anaboliques, celui-ci est transformé en dérivés qui seront excrétés dans le milieu extracellulaire comme indiqué dans la figure ci-après (Fig. 5, page 27). En l'absence d'oxygène, la fermentation crée une quantité d'énergie moindre ; le pyruvate est converti, ou fermenté en lactate lors de la fermentation lactique et excrété dans le milieu de culture.

Mais un large groupe de molécules est aussi formé lors de la fermentation du glucose par *B. subtilis*. En effet comme la plupart des *Enterobacter*, *B. subtilis* est capable de réaliser la fermentation butanediolique, le pyruvate est alors transformé en acétoïne qui sera ensuite réduit en 2-3 butanediol et excrété dans le milieu. Il n'est pas rare que lors d'une même culture *B. subtilis* excrète à la fois du lactate et du 2-3 butanediol. Néanmoins, la fonction essentielle du pyruvate est d'alimenter le cycle de Krebs.

Le cycle de Krebs, ou cycle du citrate, est une voie métabolique centrale pour la formation de métabolites intermédiaires et primaires. Au cours des 8 étapes de ce cycle, les deux atomes de carbone du groupement acétyl de l'acétyl-coenzymeA seront relâchés sous forme de CO<sub>2</sub> et une molécule d'oxaloacétate sera régénérée (Fig. 5, page 27). Ce cycle fournit des intermédiaires carbonés à l'anabolisme. Le substrat principal du cycle de Krebs, l'acétyl-CoA peut soit entrer dans le cycle de Krebs soit être intégré dans la voie de biosynthèse des acides gras, ou encore être converti en acétate avec production d'ATP.

Considéré longtemps comme un microorganisme aérobic strict, la capacité de *B. subtilis*, à croître en anaérobiose n'a été découverte qu'il y a une dizaine d'années (Quadri *et al.*, 1998). Cette découverte a ouvert l'étude de l'adaptation de son métabolisme, en particulier le cycle de Krebs, à des conditions limitantes en oxygène (Cruz *et al.*, 2000; Marino *et al.*, 2000). Lors de la croissance en aérobiose en présence d'un excès de glucose comme seule source de carbone et d'une source d'azote (glutamate ou ammonium), la glycolyse suffit à la cellule pour produire de l'énergie directement sous la forme d'ATP par la conversion du glucose en pyruvate et indirectement sous la forme de pouvoir réducteur converti par phosphorylation oxydative. De plus, la conversion de l'acétyl-CoA en acétate, alors exporté, fournit de l'ATP supplémentaire. Si le glucose vient à manquer, le flux à travers le cycle de Krebs peut alors augmenter *via* l'assimilation du glutamate comme source de carbone de rechange ou des produits secondaires précédemment excrétés (Nakano *et al.*, 1997) mais, en contre-partie, la croissance sera plus lente.

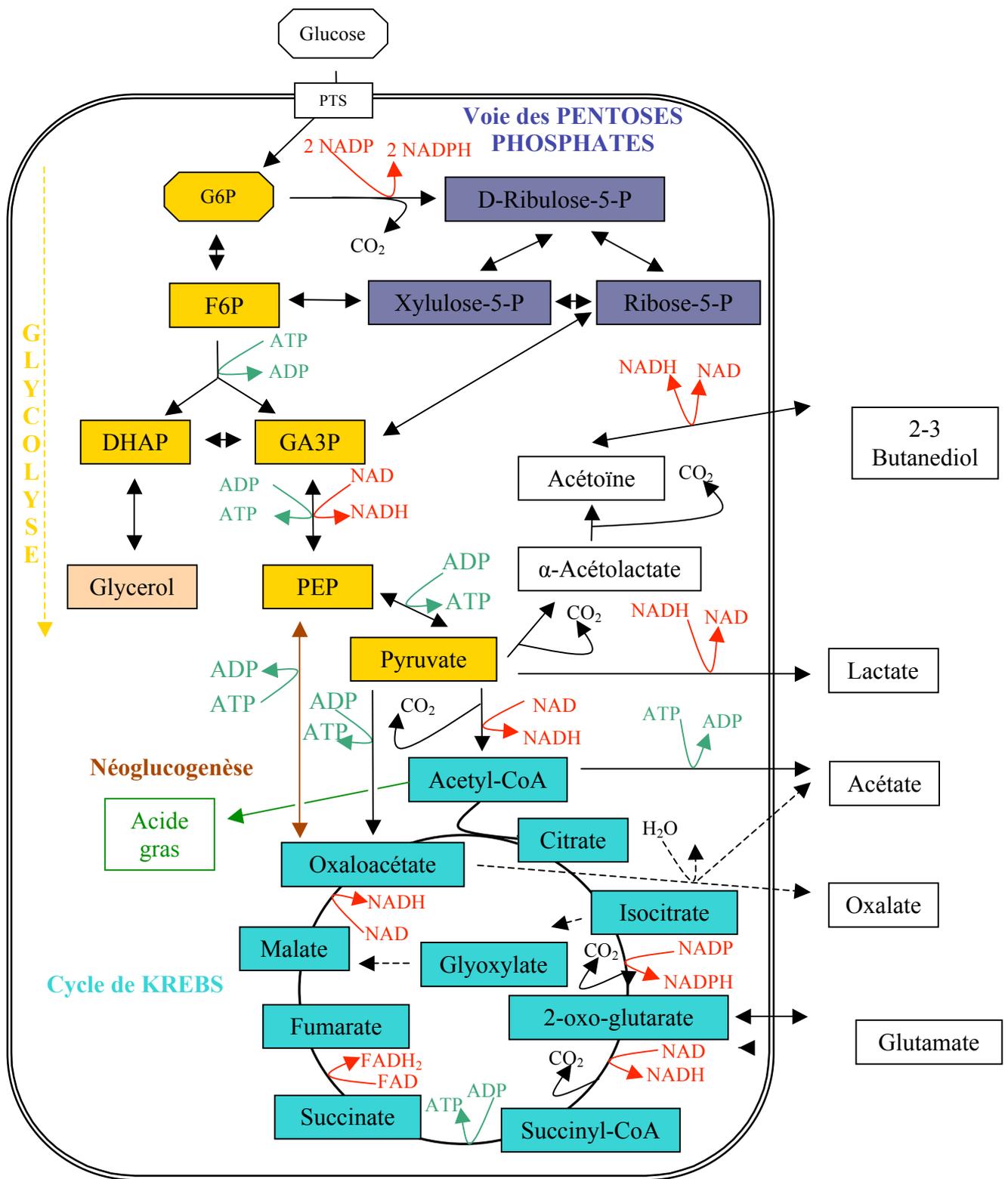


Fig. 5 Métabolisme du glucose chez *B. subtilis* : le devenir du pyruvate et la formation des métabolites primaires. Les voies en pointillés représentent des voies inexistantes ou mal connues chez *B. subtilis*.

L'oxaloacétate est un précurseur de l'aspartate. Il est produit au cours du cycle de Krebs, mais est aussi généré par la pyruvate carboxylase à partir du pyruvate, étape en fait nécessaire puisqu'une certaine quantité d'oxaloacétate est requise pour démarrer le cycle. Lorsque *B. subtilis* pousse uniquement sur des sources de carbone qui entrent par le cycle de Krebs, ces substrats sont convertis en oxaloacétate dans le cycle, qui constitue alors la principale source de carbone pour la néoglucogenèse : l'oxaloacétate sera converti en phosphoénolpyruvate (PEP) par la phosphoénolpyruvate carboxykinase ou par la malate décarboxylase.

Par ailleurs, comme nous le verrons par la suite, il est possible de retrouver dans le milieu de culture de l'oxalate. La formation de cet acide est mal connue à l'heure actuelle, et n'a jamais été décrite chez *B. subtilis* mais des études récentes font part de son existence et de son rôle dans l'assimilation du potassium chez *B. edaphicus* (Sheng et He, 2006). Deux voies sont possibles pour la formation de l'oxalate, tout d'abord l'hydrolyse de l'oxaloacétate par une oxaloacétase conduit à la formation d'un acétate et d'un oxalate. Cette voie semble la plus probable puisque la deuxième possibilité est celle qui provient de la dissociation du glyoxylate qui ne semble pas une voie métabolique privilégiée chez *B. subtilis* (Sonenshein *et al.*, 2002).

#### 1.4. LES LIPOPEPTIDES DE *B. SUBTILIS*

*B. subtilis* produit, par voie non ribosomique, trois familles de lipopeptides, les surfactines, les iturines et les fengycines. Les surfactines et les iturines sont des heptapeptides cycliques reliés par une liaison ester à une chaîne d'acide gras  $\beta$ -hydroxylée pour les surfactines et par une liaison amide à une chaîne d'acide gras  $\beta$ -aminée pour les iturines. Les fengycines ou plipastatines sont des décapeptides partiellement cycliques reliés à une chaîne d'acide gras  $\beta$ -hydroxylée. Ces différentes familles sont composées de différents isomères qui sont fonction de la longueur de la chaîne d'acide gras et de son isomérisation (Bonmatin *et al.*, 2003).

Nos travaux ne portant que sur la surfactine et la fengycine, les mécanismes de synthèse et leur régulation seront détaillés, ainsi que leurs propriétés.

## 1.4.1. La surfactine

La surfactine est connue pour ses propriétés tensioactives, comme son nom l'indique c'est un surfactant. C'est un heptapeptide cyclique relié à une chaîne d'acide gras  $\beta$ -hydroxylée pouvant varier de 13 à 16 carbones. La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu, donnant la configuration LLDLLDL (Fig. 6, page 29).

Les acides aminés L-Glu et L-Asp renforcent le caractère amphiphile (peptide hydrophile + lipide hydrophobe) responsable de ses propriétés tensioactives. La production de cette molécule chez *B. subtilis* s'effectue normalement en fin de phase exponentielle de croissance.

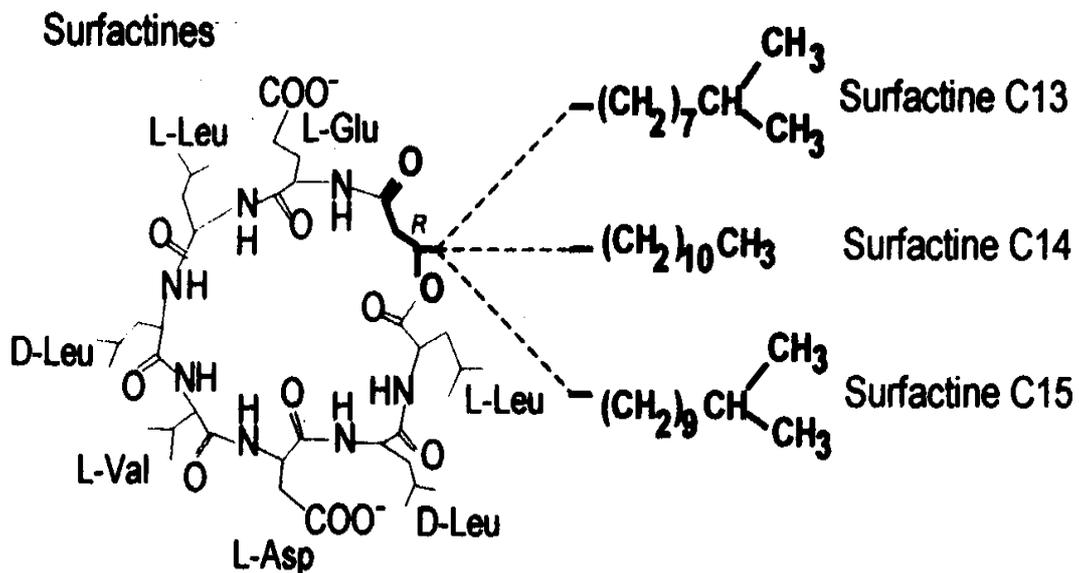


Fig. 6 Structure détaillée des isomères possibles de la surfactine

La grande diversité des lipopeptides s'exprime par l'incorporation dans leur structure primaire de différents acides aminés et acides gras. Les surfactines peuvent ainsi présenter une variété d'homologues de substitution des constituants de la partie heptapeptidique (Tableau 1, page 30).

Tableau 1 Séquences peptidiques des homologues de surfactine de *B. subtilis*.  
Les acides aminés de substitution sont en gras

Noms	Acides aminés et position							Références
	(série D ou L)							
	L1	L2	D3	L4	L5	D6	L7	
S (1)	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	1
[Gln1] S	<b>Gln</b>	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	2
[Ala4] S	Glu	Leu	Leu	<b>Ala</b>	Asp	Leu	Leu	3
[Leu4] S	Glu	Leu	Leu	<b>Leu</b>	Asp	Leu	Leu	4
[Ile4] S	Glu	Leu	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	Leu	4
[Val7] S	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	5
[Ile7] S	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	6
[Ile4,7] S	Glu	Leu	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	<b>Ile</b>	7
[Ile2,4,7] S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	<b>Ile</b>	7
[Ile2] [Val7] S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	4
[Val2] [Ile7] S	Glu	<b>Val</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	4
[Val2,7] S	Glu	<b>Val</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	4
[Ile2,7] S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	4

1 (Arima et al., 1968); 2 (Trischman et al., 1994); 3 (Peypoux et al., 1994); 4 (Bonmatin et al., 1994); 5 (Peypoux et al., 1991); 6 (Baumgart et al., 1991); 7 (Grangemard et al., 1997).

#### 1.4.1.1. Mécanisme et régulation de la synthèse de la surfactine

La synthèse de la surfactine nécessite la présence de l'opéron *surfA*, long de 25 kb ; il code chez *B. subtilis*, pour des complexes multienzymatiques impliqués directement dans le mécanisme non ribosomique. Il est composé de quatre gènes : *surfA-A*, *surfA-B*, *surfA-C* et *surfA-D*. Chaque gène code pour une synthétase et les modules de celle-ci permettent l'incorporation des différents acides aminés et l'allongement du peptide (Fig. 7, page 31). Le gène *surfA-A* code pour les trois premiers modules qui incorporent Glu, Leu et D- Leu, la présence du domaine E permet l'épimérisation de la L-Leu. Le gène *surfA-B* code pour les trois domaines suivants qui incorporent Val, Asp et D-Leu. Le dernier module est codé par *surfA-C*, qui incorpore le dernier résidu Leu.

Enfin le gène *surfA-D* semble jouer un rôle important dans l'initiation de la biosynthèse de la surfactine. Il code pour une thioestérase/acyltransférase externe qui réalise le transfert de l'acide gras sur le résidu Glu et stimule la formation d'un  $\beta$ -hydroxyacyl-glutamate (Steller et al., 2004).

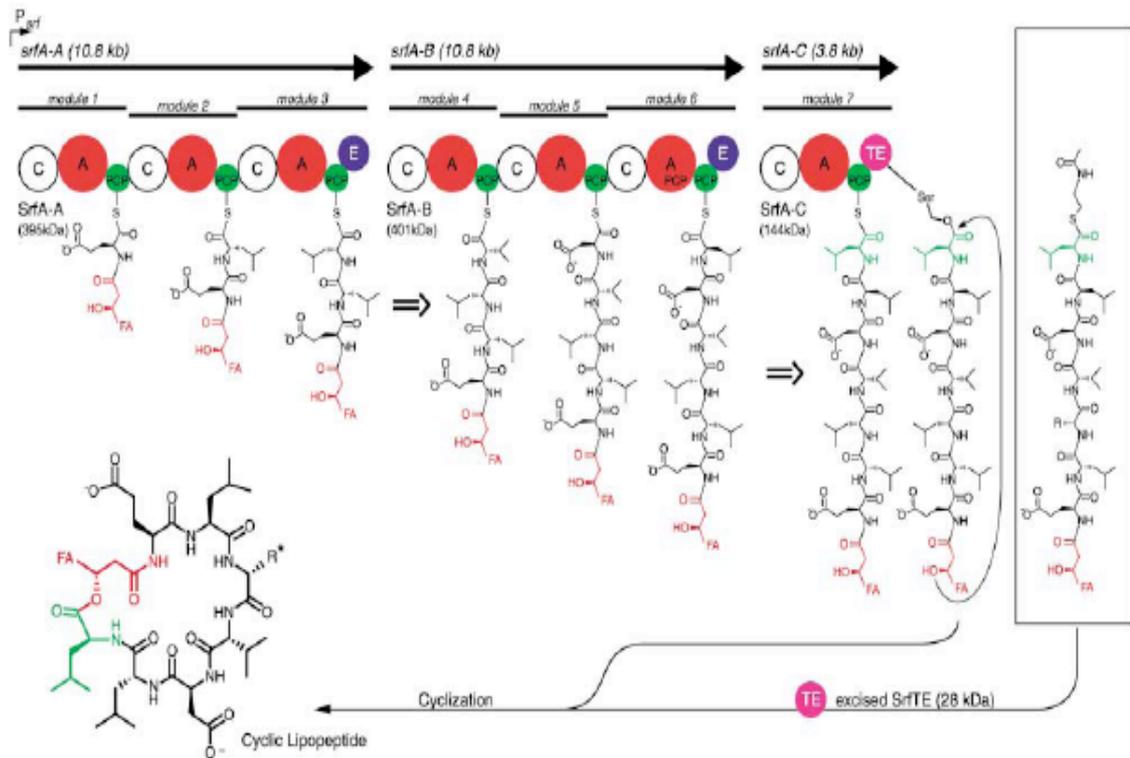


Fig. 7 Schéma de synthèse de la surfactine (Bruner *et al.*, 2002).

La cyclisation du peptide se déroule au niveau du domaine Te par une réaction d'acylation / déacylation (Bruner *et al.*, 2002). Celle-ci permet une macrocyclisation stéréo et régiospécifique grâce à l'ajout d'un groupement hydroxyle sur le groupe carboxylique de l'acide aminé L-Leu7 pour produire une lactone cyclique caractéristique des biosurfactants (Bruner *et al.*, 2002).

Une particularité de l'opéron *srfA* est la présence du petit gène *comS* niché au sein du gène *srfA-B* (Nakano et Zuber, 1989). La présence de ce gène, codant pour un facteur de compétence, rend la synthèse de surfactine concomitante avec des changements physiologiques de la souche. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, de par la présence de *comS*, l'expression de l'opéron *srfA* est au cœur de nombreux mécanismes de régulation.

#### 1.4.1.1.1. Les voies qui régulent l'expression de l'opéron *srfA*

L'expression de l'opéron *srfA* est régulée durant la phase exponentielle de croissance par des phéromones du quorum-sensing qui interviennent également dans des phénomènes tels que la compétence et la sporulation (Cosby *et al.*, 1998). En effet, la production de surfactine peut être activée tout d'abord par un facteur extracellulaire ComX.

Ce dernier s'accumule dans le milieu de culture où il est détecté par le système de transduction de signal à deux composants ComA et ComP (Solomon *et al.*, 1996; Cosby *et al.*, 1998). La transcription de l'opéron *srfA* est directement activée par la forme phosphorylée de ComA (ComA~P), qui se fixe au niveau du promoteur  $P_{srfA}$ , cette phosphorylation étant contrôlée par ComP (Fig. 9, page 33). Ce mécanisme de régulation est complexe et a fait l'objet de nombreuses études. D'une part, une analyse mutationnelle de la région régulatrice de l'opéron *srfA* a révélé l'existence de deux régions symétriques situées en amont du promoteur  $P_{srfA}$  (Fig. 8, page 32). Ces régions joueraient un rôle dans l'activation de la transcription de *srfA* en facilitant la coopération entre les dimères de ComA et l'ARN polymérase (Nakano et Zuber, 1993). Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que sous le contrôle d'un autre promoteur ( $P_{spac}$ ), l'expression de *srfA* est similaire en présence ou non de ComA et ComP.



Fig. 8 Séquence nucléotidique de la région promotrice de  $P_{srfA}$ . La séquence de *srfA* codant pour la NRPS est en italique. La séquence est numérotée à partir du site d'initiation de la transcription, identifié par une astérisque. Les régions -10 et -35, le RBS et les sites de restriction sont indiqués ainsi que les régions permettant l'accrochage de ComA (flèches en dessous de la séquence) (Nakano et Zuber, 1991).

De plus, il existe une séquence avant l'opéron *srfA*, incluse entre le site de restriction *HaeIII* et le site de fixation au ribosome (RBS : Ribosome Binding Site) du gène *srfA-A* qui semble essentielle pour l'expression de cet opéron quand il est sous la dépendance de son promoteur natif (Nakano et Zuber, 1991).

D'autre part, comme schématisé ci-dessous (Fig. 9, page 33), de nombreux facteurs de régulation Rap et des phéromones jouent un rôle très important dans la régulation de l'opéron *srfA* chez *B. subtilis*. C'est le cas notamment de RapC qui permet de déphosphoryler ComA~P, ce qui tend à réguler négativement la transcription de *srfA* (Nakano et Zuber, 1991; Nakano *et al.*, 1991; Solomon *et al.*, 1996). L'expression de *rapC* est réprimée par PhrC, une autre phéromone. L'expression de *phrC* est elle-même dépendante de Spo0H, un facteur sigma exprimé au début du phénomène de sporulation (Solomon *et al.*, 1996; Cosby et Zuber, 1997). Quand PhrC est sécrété dans le milieu, il pénètre alors dans la cellule grâce à l'oligopeptide permease Spo0K (Grossman, 1995; Lazazzera *et al.*, 1997). L'accrochage de ComA à l'ADN est réprimé par RapH (Fig. 9, page 33), ce qui engendre la sous-expression de *srfA* (Hayashi *et al.*, 2006). De plus, *comK* active l'expression de *rapH*, créant ainsi une boucle de régulation de l'expression de *srfA*, puisque comme nous l'avons vu précédemment l'expression de *comK* est elle-même activée par le produit de l'expression de *srfA*, à savoir ComS.

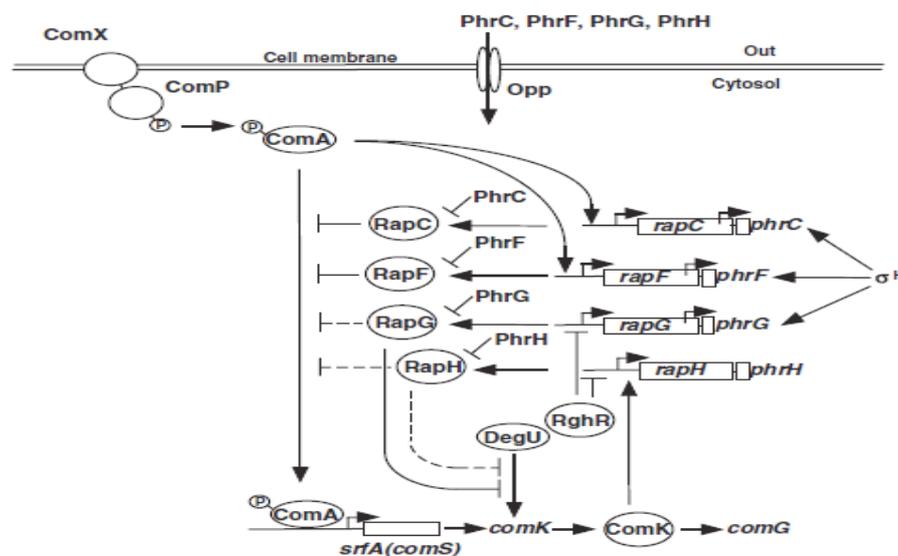


Fig. 9 Représentation schématique de la régulation de l'opéron *srfA*. Les flèches indiquent l'activation, l'incorporation d'oligopeptides ou la transcription des gènes. Les barres en "T" représentent l'inhibition de l'expression des gènes (Hayashi *et al.*, 2006).

Enfin, la composition du milieu de culture influe aussi sur l'expression de *srfA*. Des études ont en effet montré que la présence en excès de glucose et de glutamine dans le milieu réprime de façon synergique la transcription de *srfA* (Nakano et Zuber, 1989). L'augmentation de la concentration en casamino-acides engendre aussi une répression de l'expression de *srfA* par l'intermédiaire du répresseur nutritionnel CodY (Serror et Sonenshein, 1996).

1.4.1.1.2. Les voies régulées par l'expression de l'opéron *srfA*

Comme cela vient d'être évoqué, l'opéron *srfA* a la particularité de posséder le gène *comS* inséré dans le gène *srfA-B* : par conséquent des modifications dans la régulation de *srfA* modifient directement les voies où *comS* est impliqué, à savoir, la compétence, la sporulation et la mobilité cellulaire. ComS est pour la cellule le messager qui répond à un stress essentiellement nutritif, celui-ci a pour seule cible connue ComK. ComK déclenche alors des régulations en cascade pour répondre aux nouveaux besoins de la cellule (Fig. 10, page 34). La principale cascade est celle liée à la compétence : en réponse à un stress nutritif la cellule va mettre en œuvre un mécanisme d'incorporation d'ADN étranger. Mais l'expression de *comK* influe aussi sur les mécanismes de la mobilité par l'intermédiaire des gènes impliqués dans la structure des flagelles (*flgK*, *flgL*, etc...). Des travaux récents basés sur la transcriptomique et la technologie des puces à ADN ont décrit ces mécanismes (Hamoen *et al.*, 2002; Ogura *et al.*, 2002; Berka *et al.*, 2002), et ils ont fait l'objet d'une revue complète (Hamoen *et al.*, 2003b).

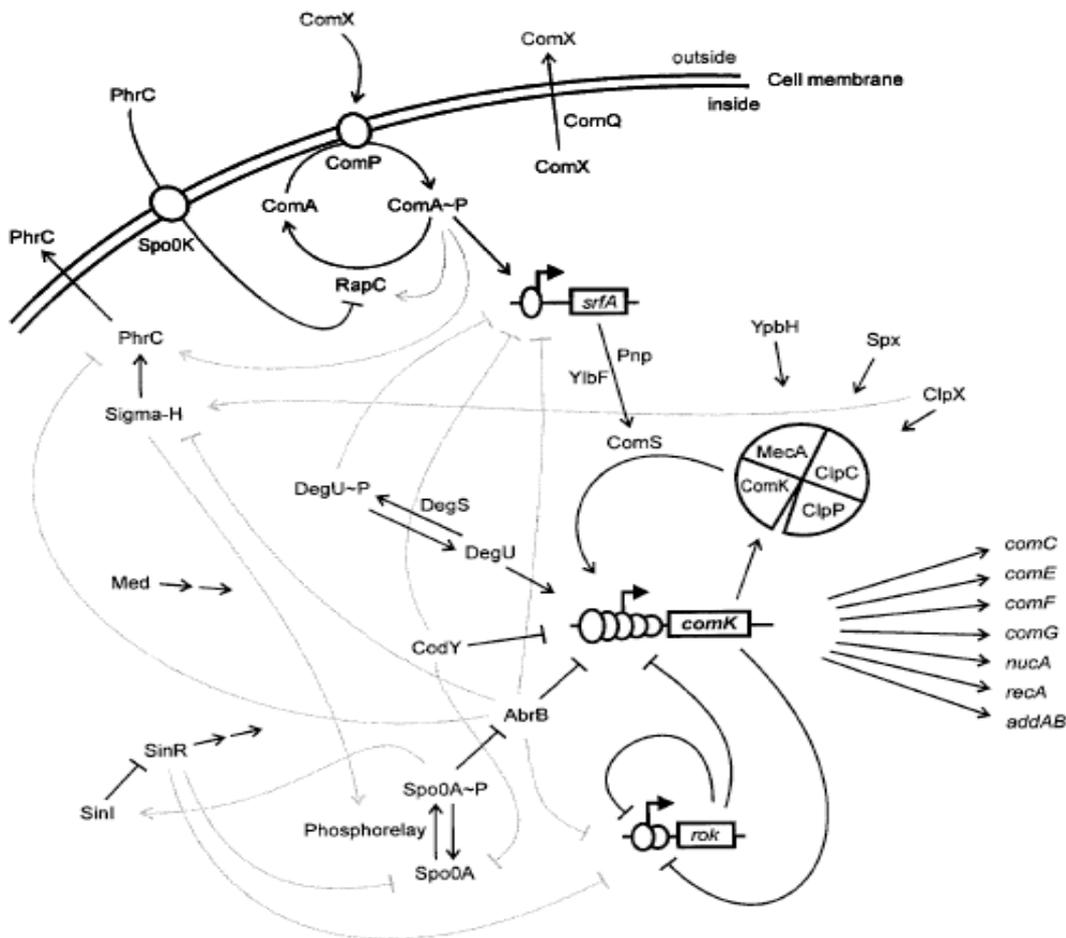


Fig. 10 Régulation de l'opéron *srfA* et voies régulées par l'expression de *comS*. Les lignes noires définissent les voies de régulation impliquées dans le développement de la compétence. Les lignes grises représentent le nombre important de connexions qui régulent ces différentes voies. Les flèches et les barres en « T » indiquent respectivement une activation ou une répression (Hamoen *et al.*, 2003b).

C'est ainsi que ComS cause le relargage et l'activation du facteur spécifique de l'initiation de la compétence, ComK, du complexe protéolytique ClpC-MecA (Fig. 11) (Ogura *et al.*, 1999). Par ailleurs, ComK peut conduire lui-même sa transcription (Maamar et Dubnau, 2005) et sa concentration dans la cellule augmente rapidement, ce qui provoque la transcription des gènes tardifs de la compétence impliqués dans l'incorporation d'ADN (*comE*, *comF*, *comC* et *comG*) et dans le métabolisme et la recombinaison de l'ADN (*nucA*, *addBA*, et *recA*) (van Sinderen et Venema, 1994; van Sinderen *et al.*, 1995). ComK se fixe aux régions promotrices de nombreux gènes par reconnaissance d'une séquence spécifique appelée la boîte K ou K-box (Hamoen *et al.*, 2002).

Comme dans tout mécanisme de régulation cellulaire, il existe des activateurs de *comK*, dont ComK lui-même, c'est le cas par exemple de DegU. Il existe aussi de nombreux répresseurs de *comK* incluant CodY, AbrB et Rok (Serror et Sonenshein, 1996; Bergara *et al.*, 2003; Hamoen *et al.*, 2003a; Hamoen *et al.*, 2003b).

En définitive, la cascade de régulation impliquant les gènes *srfA*, *comS* et donc *comK*, active la transcription d'une centaine de gènes impliqués dans la compétence, la structure et le clivage de l'ADN, la capacité de la cellule à être transformée, sa mobilité, mais aussi la biosynthèse d'arginine et les mécanismes de translocation (Fig. 11, page 35).

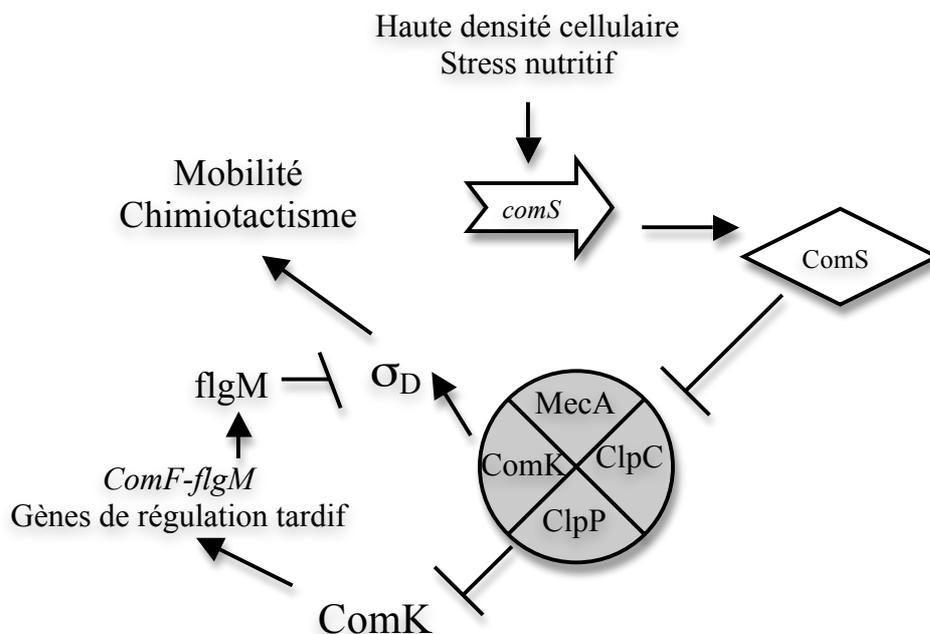


Fig. 11 Régulation de l'opéron *srfA* et voies régulées par l'expression de *comS*. Les flèches et les barres en « T » indiquent respectivement une activation ou une répression (Bergara *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.2. Les propriétés des surfactines

Les lipopeptides appartenant à la famille des surfactines présentent les propriétés caractéristiques des composés amphiphiles et sont capables de s'organiser en micelles à faible concentration en solution aqueuse. Les activités biologiques, physico-chimiques, de surface et interfaciales de la surfactine sont conditionnées par cette amphiphilie (Osman *et al.*, 1998).

##### 1.4.1.2.1. Propriétés tensioactives et moussantes

Les surfactines sont parmi les plus puissants biosurfactants connus (Peypoux *et al.*, 1999). En effet, en solutions aqueuses, au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), les surfactines s'agrègent spontanément pour former des micelles dans lesquelles la partie polaire est exposée à l'eau (Ishigami *et al.*, 1995; Deleu *et al.*, 1999a; Deleu *et al.*, 1999b; Shen *et al.*, 2009).

La CMC des surfactines est de l'ordre de 9  $\mu\text{M}$ . Les surfactines permettent d'abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à  $27 \cdot 10^{-3} \text{ Nm}^{-1}$  (Kell *et al.*, 2007).

Ces propriétés sont fonction de la température mais surtout du pH de la solution. Par ailleurs, la présence de sels dans la phase aqueuse influence également ces paramètres ; par exemple, le NaCl diminue la CMC (Thimon *et al.*, 1992).

Des études ont été menées sur la capacité des lipopeptides à produire des mousses. Par exemple, à longueur de chaîne lipidique égale, la surfactine forme une mousse plus dense que l'iturine A, mais cette dernière assure une meilleure stabilité de la mousse (Razafindralambo *et al.*, 1996).

Les surfactines ont été aussi présentées pour s'impliquer dans les phénomènes de *swarming*, *spreading* et *swimming*, c'est-à-dire dans la colonisation de milieux par *B. subtilis*. En effet, la présence de surfactine dans le milieu permet de réduire la tension superficielle de celui-ci et ainsi favoriser la dispersion de la colonie sous forme de dendrites. Par ailleurs, la surfactine semble être nécessaire à la formation de pellicules à l'interface air/liquide (Kearns et Losick, 2003; Kinsinger *et al.*, 2003; Julkowska *et al.*, 2004; Hofemeister *et al.*, 2004; Julkowska *et al.*, 2005; Leclère *et al.*, 2006; Hamze *et al.*, 2009).

De plus des effets synergiques entre différentes familles de lipopeptides pour former des micelles mixtes ont déjà été observés par exemple entre des surfactines et des iturines (Thimon *et al.*, 1992). Leurs propriétés ont des effets comparables au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) mais les surfactines ont l'avantage sur ce composé synthétique d'être non toxiques, d'avoir une faible CMC, d'être biodégradables et compatibles avec l'environnement, ce qui de nos jours est un des facteurs les plus importants à considérer lors de la valorisation d'une substance (Peypoux *et al.*, 1999; Deleu *et al.*, 1999a).

#### 1.4.1.2.2. Propriétés biologiques

Les surfactines possèdent aussi des propriétés antibactériennes, antivirales, antitumorales, hypocholestérolémiantes, antifongiques, antimycoplasmes et inducteur du mécanisme de résistance des plantes contre les phytopathogènes (Vollenbroich *et al.*, 1997a; Vollenbroich *et al.*, 1997b; Peypoux *et al.*, 1999; Ongena *et al.*, 2007). Elles peuvent aussi être utilisées en bioremédiation pour la dépollution des sols (Kosaric, 2005; Mulligan, 2005).

Par contre, elles ne possèdent pas intrinsèquement de propriétés antifongiques, mais ont des effets synergiques sur l'activité antifongique de l'iturine A et de la fengycine (Maget-Dana *et al.*, 1992; Leclère *et al.*, 2006; Ongena *et al.*, 2007; Ongena et Jacques, 2008). Une autre de leurs propriétés intéressantes est leur faculté à dégrader certains hydrocarbures (Kosaric, 2005).

#### 1.4.1.2.3. Activité hémolytique

Les propriétés amphiphiles des surfactines leur permettent d'interagir avec des membranes biologiques et de déstructurer ces dernières (Maget-Dana et Ptak, 1995; Carrillo *et al.*, 2003; Kell *et al.*, 2007). C'est cela qui leur confère des activités hémolytiques et des activités antimicrobiennes. L'activité hémolytique est très aisément détectée car lorsque les cellules produisent de la surfactines, une zone de lyse en milieu solide contenant des érythrocytes (gélose au sang) peut être détectée (Nakano *et al.*, 1988).

1.4.2. Les fengycines ou les plipastatines

Les plipastatines, encore appelées fengycines, sont des lipopeptides composés d'un décapeptide (Fig. 12, page 38). La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-D-Orn-D-Tyr-D-AThr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-Tyr-Ile. La partie cyclique est réalisée grâce à une liaison ester entre le 3<sup>ème</sup> acide aminé (L-Tyr) et le 10<sup>ème</sup> (L-Ile) (Deleu *et al.*, 1999a). Le premier acide aminé (L-Glu) est lié au groupement hydroxyle d'un acide gras  $\beta$ -hydroxylé (Tsuge *et al.*, 1999) possédant entre 13 et 17 atomes de carbone (Lin *et al.*, 1999). La transcription des gènes codant pour la plipastatine commence au moment de la phase exponentielle tardive (Lin *et al.*, 1999).

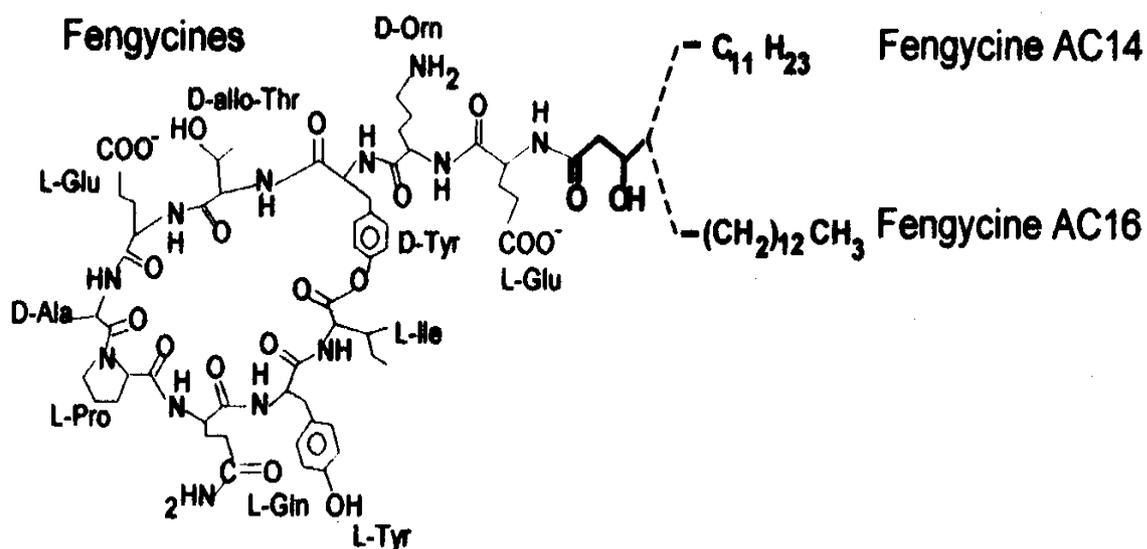


Fig. 12 Structure détaillée des fengycines A

1.4.2.1. Mécanisme et régulation de la synthèse de la plipastatine

Chez *B. subtilis*, la synthèse de la plipastatine nécessite la présence de l'opéron *pps*, long de 38 kb, qui code pour des complexes multienzymatiques impliqués directement dans le mécanisme non ribosomique. Il est composé de cinq gènes : *ppsA*, *ppsB*, *ppsC*, *ppsD* et *ppsE*. Comme décrit dans la figure 13, le gène *ppsA* code pour les deux premiers modules qui incorporent Glu et D-Orn ; *ppsB* pour Tyr et D-AThr ; *ppsC* pour Glu, D-Ala ou D-Val ; *ppsD* pour Pro et Glu ; *ppsE* pour Tyr et Ile. Comme pour la surfactine il existe plusieurs formes de fengycines ; on distinguera la fengycine A, qui possède une D-Ala, de la fengycine qui possède à la place une D-Val.

De même, la plipastatine et la fengycine sont souvent confondues alors que leur séquence péptidique est différente, c'est ainsi que les deux tyrosines présentes dans le cycle sont d'isomérisie inverse chez la plipastatine A. Une étude comparative de deux opérons *pps* chez *B. subtilis* 168 et *fen* chez *B.subtilis* F29-3 montre que ces deux opérons présentent de grandes similarités de séquence (Lin *et al.*, 1999):

78,9 % de similarité entre *ppsA* et *fenC* ; 80,2 % entre *ppsB* et *fenD* ; 81,3 % entre *ppsC* et *fenE* ; 72,3 % entre *ppsD* et *fenA* et 73,9 % entre *ppsE* et *fenB*.

A l'extrémité des modules 2, 4, 6 et 9 se trouve un domaine d'épimérisation (E) qui permet de transformer l'acide aminé de configuration L en configuration D (Fig. 13, page 39). Par ailleurs, sur le dernier domaine (module du gène *ppsE*), le peptide linéaire néosynthétisé est transféré du résidu actif sérine du domaine T au domaine TE qui catalyse ensuite la formation d'une lactone par réaction entre le groupement hydroxyle de l'acide aminé L-Tyr3 et le groupement carboxylique de l'acide aminé L-Ile10 (Lin *et al.*, 1999).

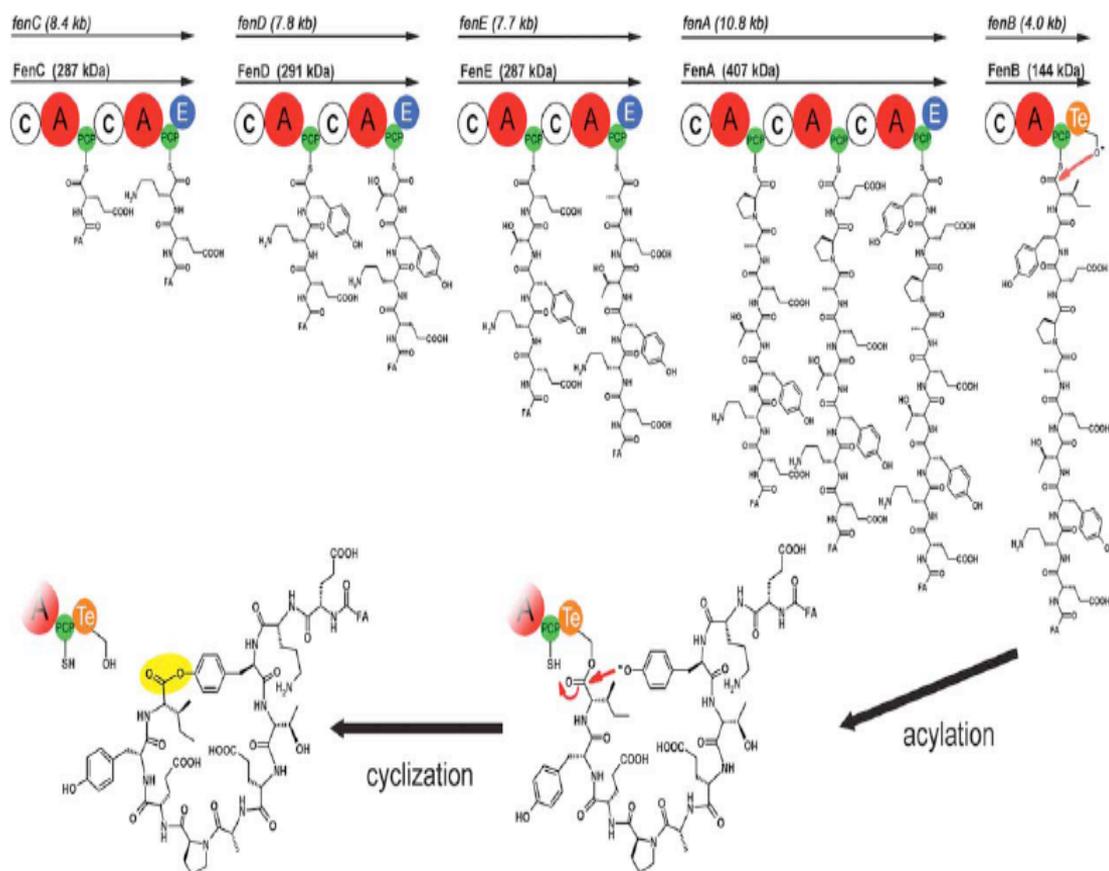


Fig. 13 Schéma de synthèse de la fengycine (Samel *et al.*, 2006).

#### 1.4.2.2. Les propriétés des plipastatines ou des fengycines

Les plipastatines possèdent de très bonnes propriétés antifongiques. Comparées à la surfactine, elles présentent une activité hémolytique beaucoup plus faible mais elles agissent en synergie avec la surfactine dans des activités de lutte contre les phytopathogènes (Souto *et al.*, 2004; Ongena *et al.*, 2005; Ongena *et al.*, 2007; Ongena et Jacques, 2008).

#### 1.4.3. Domaines d'application potentielle des surfactines et des plipastatines

Le marché mondial des tensioactifs chimiques ou des biosurfactants est en constante augmentation ; il est estimé à plusieurs dizaines de milliards d'euros par an. Presque tous les tensioactifs actuellement en exploitation commerciale sont des dérivés chimiques du pétrole, mais un intérêt croissant est porté sur les tensioactifs d'origine microbienne produits par *B. subtilis*, et plus particulièrement la surfactine, car ils ont été récemment considérés comme une alternative aux tensioactifs chimiques. Par ailleurs, même à faible concentration (10 µM), cette dernière a une activité. Ces avantages en font des molécules de choix pour les industries agro-alimentaires, pétrochimiques et cosmétiques mais surtout pour des applications environnementales. De manière générale, toute industrie devant maîtriser des phénomènes d'émulsion, d'adhérence, de viscosité, d'extraction, de dispersion, de revêtement, etc... utilise des produits surfactants.

##### 1.4.3.1. En agro-alimentaire et en agriculture

Les surfactants sont utilisés en agroalimentaire lors de la transformation des produits comme agents de texture, pour la solubilisation d'arômes et l'émulsification. Mais d'autres applications existent aussi notamment en agriculture. Le large spectre antifongique et la faible toxicité *in vivo* de la fengycine ou de la plipastatine permettent, par exemple d'envisager leur utilisation pour la protection des semis et des récoltes. En effet, cette molécule est considérée comme responsable de l'antagonisme *in vitro* de plusieurs souches de *Bacillus* vis-à-vis de champignons phytopathogènes comme par exemple *Fusarium oxysporum* (Souto *et al.*, 2004). En outre, surfactines et fengycines sont capables d'induire la résistance systémique chez les végétaux contre des phytopathogènes (Ongena *et al.*, 2005; Ongena *et al.*, 2007; Ongena et Jacques, 2008).

#### 1.4.3.2. *En pétrochimie*

Les industries pétrochimiques sont sans doute les plus consommatrices de biosurfactants ; l'industrie pétrolière les utilise pour extraire le pétrole adsorbé sur la roche, pour diminuer sa viscosité afin de faciliter son transit dans les pipelines... Mais on peut également utiliser les microorganismes producteurs eux-mêmes qui, injectés dans le puits, coloniseront l'environnement tout en sécrétant leur biosurfactant. Cette industrie utilise également les biosurfactants pour tenter de réparer autant que faire se peut, les dégâts qu'elle provoque de temps à autre en mer et sur terre (Banat, 2000).

#### 1.4.3.3. *En environnement*

Les biosurfactants comme la surfactine présentent plusieurs avantages par rapport aux produits chimiques tensioactifs synthétiques, tels que leur faible concentration micellaire critique (CMC), leur biodégradabilité, et sont particulièrement bien étudiés pour les applications environnementales telles que la bioremédiation des sols et la dispersion des déversements de pétrole (Bertrand *et al.*, 1994; Kosaric, 2005; Mulligan, 2005). Leurs propriétés permettent de favoriser la récupération des polluants en facilitant leur détachement de la matrice solide.

#### 1.4.3.4. *En pharmaceutique et cosmétique*

Dans un tout autre domaine, plusieurs biosurfactants ont démontré des propriétés antimicrobiennes. Une étude estime même que la surfactine pourrait intervenir dans la lutte contre le virus VIH (Itokawa *et al.*, 1994). Elle affiche également des activités antimycoplasmiques. En outre, des molécules comme les fengycines ou plipastatines montrent un potentiel élevé en qualité d'antifongique et sont susceptibles d'entrer dans la composition des certains produits cosmétiques afin d'en améliorer la conservation (Vollenbroich *et al.*, 1997a; Vollenbroich *et al.*, 1997b; Deleu *et al.*, 1999a; Deleu *et al.*, 1999b; Deleu *et al.*, 2005). Si les propriétés antimicrobiennes de ces produits n'ont encore donné lieu à aucune exploitation commerciale, ils ont d'ores et déjà trouvé une niche potentielle dans le marché des cosmétiques, grâce à leur propriétés hydratantes et leur compatibilité avec la peau (Brown, 1991).

## 1.5. LA PRODUCTION DES LIPOPEPTIDES DE *B. SUBTILIS*

### 1.5.1. Les milieux de culture utilisés

Différents milieux de culture sont utilisés pour la croissance et la production de lipopeptides de *B. subtilis*. Leur composition contient toujours une source de carbone, apportée par un sucre, le plus souvent le glucose, mais le saccharose est aussi utilisé ; une source d'azote, apportée soit par la présence d'un acide aminé soit par du sulfate d'ammonium mais aussi par de l'extrait de levure, une source de sels organiques et des sels minéraux. Les milieux les plus couramment utilisés sont des milieux dérivés de ceux décrits par Cooper (Cooper *et al.*, 1981) et Landy (Guez *et al.*, 2008). Certaines études font état d'une optimisation du milieu de culture (Jacques *et al.*, 1999).

### 1.5.2. Les conditions de culture utilisées

La production de lipopeptides demande tout d'abord la croissance de la souche de *B. subtilis*. Pour cela deux paramètres sont essentiels : la température et l'oxygénation du milieu. Certaines études révèlent une dépendance du mécanisme de synthèse à la température, c'est le cas notamment pour la mycosubtiline (Fickers *et al.*, 2008). Pour la surfactine les températures de 30°C et 37°C sont les plus souvent utilisées, mais généralement la production est plus importante à 37°C (Ohno *et al.*, 1995). Deux types de culture sont le plus souvent mises en œuvre, soit en fiole d'Erlenmeyer, soit en bioréacteur. Ces deux types de culture seront d'ailleurs détaillés par la suite. Il a été constaté que l'approvisionnement suffisant en oxygène dissous et l'agitation mécanique dans le bioréacteur jouent un rôle crucial dans l'efficacité de la production de lipopeptides et plus particulièrement pour la surfactine (Hbid *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1999; Jacques *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 2006; Guez *et al.*, 2008). Néanmoins les conditions d'aération demeurent un problème central dans la formation abondante de mousse.

### 1.5.3. La production des lipopeptides de *B. subtilis* en bioréacteur et ses contraintes

La production de lipopeptides par *B. subtilis* en bioréacteur est couramment décrite (Cooper *et al.*, 1981). Mais le coût de la production de ces biosurfactants à grande échelle a été un obstacle pour leur développement commercial et de nombreux efforts ont été faits pour réduire les coûts.

Ainsi, différentes stratégies ont été étudiées, notamment l'amélioration des rendements de produit ou de biomasse par rapport au substrat, en optimisant le milieu de culture (Cooper *et al.*, 1981; Jacques *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2006) ou en modifiant la souche (Leclère *et al.*, 2005). D'autres études ont porté sur la conception et/ou l'optimisation du bioréacteur et du bioprocédé dans son ensemble (Davis *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2006; Guez *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

Par ailleurs, la transformation en aval du produit est dans de nombreux procédés biotechnologiques responsable pour 60% du coût total du produit. Le principal obstacle à la commercialisation de ces composés tensioactifs réside dans le fait qu'ils provoquent une importante formation de mousse, rendant leur récupération à partir du bouillon de culture quasi impossible et leur purification très complexe. En effet, la combinaison d'une production de composés tensioactifs moussants à l'échelle du bioréacteur, de son aération et de son agitation mécanique occasionne un fort moussage, rendant le procédé difficilement contrôlable (notamment par les pertes importantes de volume réactionnel) et le produit difficilement utilisable.

Pour se soustraire de cet ajout d'oxygène par barbotage, d'autres solutions ont été envisagées, c'est le cas notamment d'une culture anaérobie en présence de nitrate (Davis *et al.*, 1999) ou encore de peroxyde d'hydrogène (Lee et Kim, 2008). Mais ces différentes stratégies ne suppriment pas totalement la formation de mousse et engendrent par ailleurs une croissance plus faible qu'en présence d'oxygène.

Une stratégie intéressante consiste à contrôler le moussage et à récupérer la mousse qui a débordé dans des collecteurs de fractions. Ce type de dispositif est refroidi afin de favoriser la condensation de la mousse et ainsi limiter le volume de collecte. Ce processus a été employé par différents auteurs y compris au laboratoire (Cooper *et al.*, 1981; Davis *et al.*, 2001; Guez *et al.*, 2007) et a permis l'extraction en continu des tensioactifs grâce au débordement de mousse (Fig. 26, page 94). En 2001, Davis et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'agitation sur la production de surfactine par *B. subtilis* ATCC 21332 ; ils ont obtenu une production de surfactine de 104 mg, un rendement de conversion de glucose en surfactine ( $Y_{P/S}$ ) de 2,6 mg/g et ont atteint un taux d'extraction de 85% à 100% mais avec en contrepartie une perte élevée et non contrôlée du volume de culture (Davis *et al.*, 2001). Avec un procédé moussant très proche, mais avec un recyclage de la biomasse présente dans la mousse, une étude plus récente a évalué l'impact du  $K_La$  sur la production de surfactine, révélant qu'une agitation de 300 rpm et une aération de 1,5 vvm étaient des conditions optimales permettant d'atteindre une vitesse de production de 106 mg/L/h et un  $Y_{P/S}$  de 161 mg/g (Yeh *et al.*, 2006).

Bien que le taux d'extraction des biosurfactants dans la mousse soit souvent très élevé, le problème est que la mousse emporte aussi une grande partie de la biomasse et des substrats du milieu. Cela représente un obstacle majeur pour la production industrielle de lipopeptides. La suppression de mousse est alors envisagée, et est réalisée par l'ajout de produits antimousse d'origine chimique, mais ceux-ci peuvent affecter la physiologie de la souche et la pureté des produits (Lee et Kim, 2008). Par ailleurs, l'ajout d'antimousse est fortement déconseillé lors de procédé en bioréacteur à membrane car il conduit à une réduction des flux de perméation de l'ordre de 60% (McGregor *et al.*, 1988). Il devient donc nécessaire de trouver des solutions innovantes à ce problème d'aération des cultures, pour supprimer cette formation de mousse, ce qui permettra d'envisager une production et une extraction des lipopeptides en continu grâce au couplage de membranes de filtration. Deux stratégies peuvent donc être envisagées, soit limiter la formation de bulles dans le bioréacteur, soit extraire le produit assez rapidement pour limiter la formation de mousse. Une des solutions proposées pour répondre à cette problématique est l'utilisation de bioréacteur à membrane. Le couplage d'un bioréacteur et d'une membrane est couramment utilisé et permet d'envisager une réponse efficace soit pour transférer de l'oxygène dans le milieu, soit pour extraire le produit du bouillon de fermentation.

## 1.6. LES BIOREACTEURS A MEMBRANE

### 1.6.1. Rappels sur les bioréacteurs

Il existe plusieurs façons de cultiver un microorganisme dans un bioréacteur, soit en culture discontinue appelée « batch » où aucun ajout n'est réalisé dans le bioréacteur, soit en culture continue à laquelle du milieu frais est ajouté en permanence dans le bioréacteur. Enfin une culture semi-discontinue appelée « fed batch », combinant les caractéristiques des deux précédentes. Durant leur croissance, lors d'une culture discontinue, les cellules suivent consécutivement plusieurs phases. Tout d'abord, une phase de latence durant laquelle les cellules s'adaptent au milieu de culture ; cette latence peut être réduite en propageant les cellules dans des précultures successives et dans un milieu de composition identique ou voisine de celle du milieu du bioréacteur. Une phase exponentielle durant laquelle les cellules se multiplient très rapidement en épuisant le milieu au fur et à mesure. Une phase linéaire pendant laquelle les cellules ralentissent leur croissance en fonction de l'appauvrissement du milieu jusqu'à l'arrêt total de la croissance, parfois il y a ensuite une phase de déclin.

Lors d'une culture continue, la phase de fermentation continue est précédée d'une culture discontinue qui a lieu dans le même réacteur afin que les cellules amorcent leur phase de croissance exponentielle. Lorsque la concentration en biomasse atteint un niveau suffisant, l'alimentation par une solution nutritive et le soutirage du milieu réactionnel sont démarrés simultanément et au même débit, pour assurer la constance du volume réactionnel. Le système se stabilise après une phase transitoire qui dure 5 à 10 fois le temps de passage  $\tau = \text{Volume du bioréacteur} / \text{Débit d'alimentation}$ . Lors de cette phase stationnaire dans des cuves parfaitement agitées la concentration de chaque constituant est identique en tout point du système. Ce mode de culture permet de maîtriser le débit d'apport des différents substrats en évitant les phénomènes limitant la bioconversion microbienne.

Une bioconversion microbienne peut être étudiée au premier abord selon un schéma réactionnel simplifié où l'on considère la transformation d'un substrat principal (S : la concentration en substrat, souvent limitant) en biomasse (X : la concentration des cellules, souvent exprimée en gramme de matière sèche par litre de volume réactionnel) et en un produit (P : la concentration en produit), par exemple :  $S \xrightarrow{X} X + P$ .

Les vitesses de réaction de ces trois constituants sont généralement exprimées en g/L/h et elles sont notées respectivement  $r_S$ ,  $r_X$  et  $r_P$ . Lorsque ces vitesses sont rapportées à la concentration en catalyseur, ici la biomasse, on obtient des vitesses spécifiques. Cette notion est très importante car elle permet de prendre en compte la formation du catalyseur lui-même. Ces vitesses seront respectivement notées :

$\mu = r_X/X$  : la vitesse spécifique de croissance, en  $h^{-1}$  ;

$q_S = r_S/X$  : la vitesse spécifique d'utilisation du substrat S, en gramme de substrat consommé/g de biomasse présente/h ;

$q_P = r_P/X$  : la vitesse spécifique de formation du produit P, en gramme de produit formé/g de biomasse présente/h.

Les informations stoechiométriques peuvent être substituées par les rendements de conversion. Plusieurs combinaisons sont possibles et peuvent être déduites les unes des autres :

$Y_{X/S} = r_X/ r_S = \mu/ q_S$  : rendement de conversion du substrat en biomasse, g de biomasse formée/g de substrat consommé ;

$Y_{P/S} = r_P/ r_S = q_P / q_S$  : rendement de conversion du substrat en produit, g de produit formé/g de substrat consommé ;

$Y_{P/X} = r_P/ r_X = q_P / \mu = Y_{P/S}/Y_{X/S}$  : taux de formation du produit par rapport à la biomasse formée, g de produit formé/g de biomasse formée.

Ces différents paramètres de la fermentation permettent de réaliser une étude physiologique de la culture et d'optimiser les conditions de culture en analysant les facteurs inhibant, limitant ou induisant la croissance des cellules et/ou la production de produits. Différentes limitations liées aux substrats et aux produits peuvent avoir lieu au sein d'un bioréacteur. La croissance en bioréacteur microbien non limitée suit la loi de Monod qui est similaire à celle de Michaelis pour les enzymes (Pirt, 1975).

Les performances de bioconversion d'un bioréacteur continu sont limitées par le phénomène de lessivage qui se manifeste à des taux de dilution supérieurs à  $\mu_{max}$ . La productivité peut être améliorée en maintenant une biomasse plus importante dans le bioréacteur.

C'est dans ce contexte que les bioréacteurs à membranes ont été développés ces trente dernières années. Selon les membranes utilisées, ils offrent de nombreux avantages technologiques qui permettent d'une part la rétention des cellules qui conduit à des concentrations en microorganismes actifs très élevées et d'autre part un fonctionnement en continu qui permet de maîtriser les conditions d'environnement. Ils sont aussi une solution pour l'extraction et la purification du produit, ainsi que l'oxygénation du milieu de culture.

### 1.6.2. Les bioréacteurs à membranes

Les techniques membranaires sont utilisées en amont ou en aval de la bioconversion microbienne. Ces techniques couplant un contacteur à membrane à un bioréacteur présentent plusieurs applications. Les plus couramment utilisées, souvent basées sur des membranes poreuses, permettent le recyclage de la biomasse, l'extraction et la purification des produits ou le transfert de gaz dans un milieu. Ces technologies membranaires utilisant des fibres creuses couplées à un bioréacteur sont maintenant bien connues et maîtrisées (Boyaval *et al.*, 1998; Gabelman et Hwang, 1999; Charcosset, 2006). Dans un réacteur continu avec recyclage total de la biomasse, l'analyse des paramètres biologiques tels que les vitesses de réaction et les rendements de conversion peut être effectuée selon ces hypothèses :

- Les cuves de réactions sont supposées infiniment mélangées.
- Le volume de la cuve de fermentation est maintenu constant car les débits d'alimentation et de soutirage sont égaux.
- La membrane est supposée retenir sélectivement la biomasse, les phases liquides de part et d'autres de la membrane ayant alors des compositions identiques.
- Le temps de séjour de la biomasse dans la boucle de recirculation est supposé négligeable.
- Les analyses doivent être réalisées en régime stationnaire, dès lors :

$$r_X = 0.$$

$$r_P = P \times D$$

$$r_S = D \times (S_0 - S)$$

Le taux de dilution  $D$  étant le rapport du débit d'alimentation sur le volume de la cuve, il est exprimé en  $h^{-1}$ .

### 1.6.2.1. Les membranes séparatives liquide/liquide

Les membranes séparatives permettent la séparation des microorganismes et du milieu de culture par filtration et l'extraction des produits du milieu de culture. Le type de membrane est choisi en fonction du degré de séparation souhaité et de la nature des molécules en solution.

#### 1.6.2.1.1. Utilisation pour le recyclage des cellules.

Il existe un grand nombre d'utilisations du bioréacteur à membrane pour le recyclage des cellules lors d'une bioconversion microbienne, comme la production d'alcool, de solvant ou d'acide. Les bioréacteurs à membrane peuvent être aussi employés dans le traitement des eaux (Lafforgue C. *et al.*, 1987; Lee et Chang, 1987; Mercier *et al.*, 1998; von Weymarn *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2006; Choudhury et Swaminathan, 2006). Il n'est guère de microorganisme d'intérêt scientifique ou industriel, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, qui n'ait fait l'objet d'étude en bioréacteur à membrane. Cette technique a par exemple été employée lors d'une culture de *Bacillus* pour la production d'acide lactique (Danner *et al.*, 1998).

La microfiltration est généralement retenue pour la rétention des cellules mais des seuils de coupure plus faibles peuvent conduire à un fractionnement à l'échelle moléculaire. Le seuil de coupure choisi déterminera le taux de recyclage des cellules et d'extraction du produit. Des membranes organiques, le plus souvent en fibres creuses de dérivé de polysulfone, ou minérales en céramique, peuvent être utilisées pour l'étape de microfiltration, la taille des pores étant préférentiellement de 0,2 µm pour réaliser un recyclage total des cellules dans le bioréacteur.

Des taux de dilution élevés peuvent être plus aisément contrôlés lors du recyclage de la biomasse dans les procédés continus. Les techniques de filtration tangentielle ont montré une efficacité supérieure à celle des méthodes de séparation traditionnelles (décantation ou centrifugation) car elles assurent une homogénéité du milieu de culture grâce à la circulation continue du milieu de culture dans le filtre qui contribue à son brassage. De plus, ces techniques ont un coût d'exploitation plus faible, c'est d'ailleurs pour cela que les bioréacteurs à membrane ont été développés (Chang et Furusaki, 1991).

Ces techniques sont le plus souvent employées lors de culture continue mais elles peuvent être aussi utilisées lors de cultures semi-discontinues (Daubert *et al.*, 2003; Bae *et al.*, 2004). Deux modes de fonctionnement sont employés lors du recyclage des cellules ; soit un recyclage total, les cellules sont toutes re-injectées dans le réacteur, seul le taux de dilution varie ; soit en recyclage partiel, chaque régime permanent est caractéristique d'un couple (taux de dilution, taux de purge). Ces techniques peuvent permettre l'étude de comportements physiologiques particuliers (Uribelarrea *et al.*, 1993) et favorisent surtout les performances au niveau des productions en permettant d'atteindre des niveaux de concentrations cellulaires de l'ordre de plusieurs centaines de grammes en fonction du microorganisme et du substrat (Lafforgue-Delorme *et al.*, 1994; Xavier *et al.*, 1995). Toutefois, si les concentrations cellulaires sont très élevées, les productivités volumétriques n'augmentent pas dans les mêmes proportions car l'activité spécifique des microorganismes diminue au fur et à mesure de leur concentration (Mota *et al.*, 1987; Xavier *et al.*, 1995; Faria *et al.*, 2002). Ce phénomène est souvent propre au microorganisme et à sa concentration maximale dans le bioréacteur (200 g/L pour les bactéries, 300 g/L pour les levures). Une limitation nutritionnelle peut être aussi remarquée à haute densité cellulaire mais celle-ci peut être résolue en augmentant le taux de dilution (Park, 2004).

L'influence du taux de dilution a souvent été l'objet d'études sur la production de biomasse et sur la production des molécules d'intérêts. Lee *et al.*, en 1987 ont par exemple montré que l'augmentation du taux de dilution de 0,5 h<sup>-1</sup> à 1,5 h<sup>-1</sup> permettait une augmentation du même ordre de la biomasse produite dans le bioréacteur à membrane (40 g/L à 135 g/L). Cette observation a ensuite été vérifiée dans d'autres études (Lafforgue *et al.*, 1987; Kwon *et al.*, 2006). Les applications les plus récentes sont relatives à la production de xylitol ; dans ces études, les productions ont été menées en mode continu ou en mode semi-discontinu et ont conduit à des gains de productivité (Faria *et al.*, 2002; Bae *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2006). Bae *et al.* (2004) ont notamment montré que le recyclage total des cellules permet lors de culture en mode semi-discontinu d'augmenter 2 fois la concentration en cellules dans le bioréacteur (celle-ci restant à des valeurs raisonnables de l'ordre de 20 g/L) et de 4 fois la vitesse de production du produit par rapport au mode batch. Ce gain de productivité est aussi montré en mode continu (Kwon *et al.*, 2006) ; de plus dans cette étude, les auteurs observent une quantité de xylitol produite 11 fois plus importante dans un bioréacteur à membrane alimenté en continu par rapport à un mode batch.

Si cette technique reste l'une des plus efficaces, elle possède des facteurs limitants physiques (colmatage, diminution du transfert de masse) et biologiques (mortalité cellulaire, comportement physiologique particulier). Le colmatage est un inconvénient majeur, il se traduit par une réduction du flux de filtration, correspondant à un taux de dilution limite qui fixe la productivité volumétrique maximale. Le colmatage est fonction de nombreux paramètres, à commencer par le seuil de coupure utilisé, la nature de la membrane, la taille des particules à filtrer, etc.... (Nagata *et al.*, 1988). Dans les bioréacteurs microbiens continus, le colmatage est essentiellement causé par les cellules ou leurs débris.

Une étude récente met en relief l'impact important des polymères extracellulaires dans le colmatage des membranes en fonction de l'hydrophobie de celles-ci (Zhang *et al.*, 2008).

Dans ce type d'utilisation, des études ont montré l'importance d'un démarrage de la culture par une phase discontinue avec la sortie du perméat fermée, ceci permettant le conditionnement de la membrane et l'établissement d'une couche de biomasse à la surface de la membrane jouant le rôle d'un préfiltre et la protégeant plus ou moins du colmatage (Xavier *et al.*, 1995).

D'autres méthodes pour réduire le colmatage ont été décrites comme le nettoyage à grande eau, aussi appelé « flushing », une autre méthode dite « back-flushing » qui consiste à injecter séquentiellement du perméat à contre-courant (Nipkow *et al.*, 1989), ou l'utilisation d'écoulements turbulents au sein de la membrane (Maranges C. *et al.*, 1995; Mercier *et al.*, 1998). L'endommagement des microorganismes est aussi une des limites du système et il est d'autant plus marqué que la densité microbienne est élevée et que le temps de la fermentation est long. Cet endommagement est lié aussi aux contraintes mécaniques (imposées par la pompe et/ou par la membrane) qui influencent l'activité et l'intégrité des cellules provoquant la mortalité de celles-ci (Nipkow *et al.*, 1989; Bibal *et al.*, 1991). En plus de diminuer la production spécifique, la population de cellules biologiquement inactives peut avoir un impact non négligeable sur le colmatage. Par ailleurs l'accumulation de toxines ayant une taille plus importante que le seuil de coupure de la membrane peut inhiber la croissance et endommager les cellules. Pour limiter ce phénomène, le seuil de coupure de la membrane doit aussi être choisi en fonction du taux d'extraction souhaité pour les produits.

#### 1.6.2.1.2. Utilisation pour l'extraction des produits

La filtration tangentielle est utilisée fréquemment pour la séparation et la purification des produits pendant ou après la fermentation, ces produits étant extraits comme produits recherchés ou comme produits néfastes pour la culture cellulaire. On retrouve cette application dans de nombreux procédés dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques (Lafforgue-Delorme *et al.*, 1992; Lafforgue-Delorme *et al.*, 1994; Gabelman et Hwang, 1999), ainsi que dans la dépollution de l'eau (Lin *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons vu précédemment lors d'une culture en continu, ce procédé est souvent combiné au sein d'une seule membrane avec la rétention de la biomasse. De nombreux composés peuvent être ainsi extraits en fonction de leur taille et du seuil de coupure de la membrane utilisée. La nature des membranes utilisées et leur taille de pores ou seuil de coupure peut être choisie parmi les nombreuses possibilités qu'offrent les fabricants de membranes de filtration, de microfiltration, d'ultrafiltration ou de nanofiltration, selon les propriétés physico-chimiques du produit ou des biosurfactants produits.

Les membranes de microfiltration le plus souvent employées sont en fibres creuses. De même les membranes d'ultrafiltration utilisées seront préférentiellement en cellulose régénérée, leur seuil de coupure dépendant de la taille des molécules à séparer.

Très fréquemment étudiées depuis 20 ans, les limites de cette technique sont bien connues et reposent majoritairement sur la diminution au cours du temps du flux de perméat à cause du colmatage de la membrane (Bowen et Hall, 1995). Comme nous l'avons vu précédemment, le colmatage est essentiellement dû à l'accumulation des cellules ou de débris cellulaires à la surface de la membrane. Les constituants du milieu peuvent aussi s'adsorber à la surface de la membrane ou tout simplement obstruer les pores de celle-ci. Le colmatage par les constituants du milieu et/ou par le produit recherché est souvent le résultat d'un phénomène d'adsorption. En effet, pendant la filtration certaines molécules peuvent présenter une affinité pour la membrane et s'adsorber à la surface de celle-ci. Cette adsorption est directement liée à la quantité de l'adsorbé et de l'adsorbant dans le milieu, à l'hydrophobie de la membrane et à l'environnement physico-chimique du milieu (Nakamura et Matsumoto, 2006). En définitive l'évolution du flux de filtration est macroscopiquement reliée à la concentration totale en microorganismes, la concentration en macromolécules, la viscosité du milieu, la durée de filtration, la lyse cellulaire et la nature de la membrane (Mota *et al.*, 1987; Nagata *et al.*, 1989; Xavier *et al.*, 1995).

Des méthodes ont été décrites pour l'extraction des lipopeptides du bouillon de fermentation à partir de couplage membranaire, notamment grâce à l'utilisation de membranes d'UF avec un seuil de coupure de 10 KDa pour les biosurfactants produits par *B. subtilis* (Isa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007). Une étude récente montre d'ailleurs que l'adsorption de la surfactine sur la membrane d'UF entraîne le colmatage de la membrane et une diminution du flux de perméat. Celui-ci pouvant être réduit par « flushing » de la membrane avec une solution alcaline (Chen *et al.*, 2008a). Plus généralement, les techniques d'extraction utilisées pour les lipopeptides de *B. subtilis* sont des méthodes chimiques et/ou membranaires, nous les détaillerons par la suite. Mais celles-ci ne peuvent pour le moment pas être mises en œuvre en continu sur un bioréacteur à cause de la formation de mousse.

#### 1.6.2.2. *Les contacteurs air/liquide à membrane : une solution pour la production des biosurfactants d'origine microbienne.*

Comme cela a été évoqué précédemment, l'obstacle majeur pour la production des lipopeptides et leur extraction et purification en continu dans un procédé est l'abondante formation de mousse induite par le barbotage de l'air sous forme de bulles nécessaire à la culture. Pour répondre à cette problématique, la technologie du bioréacteur à membrane offre aussi une solution, il s'agit de transférer l'oxygène sous forme dissous dans le milieu grâce à l'utilisation d'un contacteur air/liquide à membrane, préférentiellement une membrane en fibres creuses (Fig. 27, page 98).

Cette technologie utilise une membrane en fibres creuses poreuses servant à la fois de support pour l'interface gaz/liquide et de séparateur entre la phase gaz et la phase liquide. Les deux phases sont donc totalement indépendantes : le gaz s'écoule d'un côté de la membrane et le liquide de l'autre côté sans qu'aucune des deux phases ne soit dispersée dans l'autre. L'interface gaz/liquide se forme à une extrémité des pores de la membrane et dépend de la nature et de la structure de la membrane, ainsi que des conditions de pression qui régissent le système (Remize et Cabassud, 2003). Deux types de contacts peuvent avoir lieu, soit un contact « mouillant », soit un contact « non mouillant ». Pour le transfert de composés gazeux dans la phase liquide, la résistance principale au transfert se situe le plus souvent au niveau de la phase liquide ou de la membrane elle-même (Fig. 14, page 53). Dans le cas de l'utilisation d'une membrane hydrophobe, celle-ci n'est pas mouillée par le liquide et ce dernier ne remplit pas les pores de la membrane, le contact est qualifié de non mouillant.

Dans le cas de l'utilisation d'une membrane hydrophile, la résistance au transfert se situe en phase gazeuse et le liquide remplit les pores de la membrane, le contact est qualifié de mouillant (Pankhania *et al.*, 1999). La surface de contact dans ce type de contacteur membranaire dépend de la structure et de la nature du matériau utilisé, du mode de conception du module et du type de contact entre l'interface air/liquide (Gabelman et Hwang, 1999).

Les performances d'aération de la membrane dépendent du débit de la phase liquide, de la surface de la membrane, de l'orientation des fibres creuses à l'intérieur du module et des conditions de pression des deux phases (Karoo et Sirkar, 1993; Ahmed et Semmens, 1996; Pankhania *et al.*, 1999; Gabelman et Hwang, 1999). Comme les autres techniques membranaires, celle-ci peut être soumise au colmatage soit par les microorganismes, soit par l'adsorption de certains produits. Ce colmatage a pour conséquence une baisse du transfert de matière d'une phase à l'autre (Pollet *et al.*, 2008).

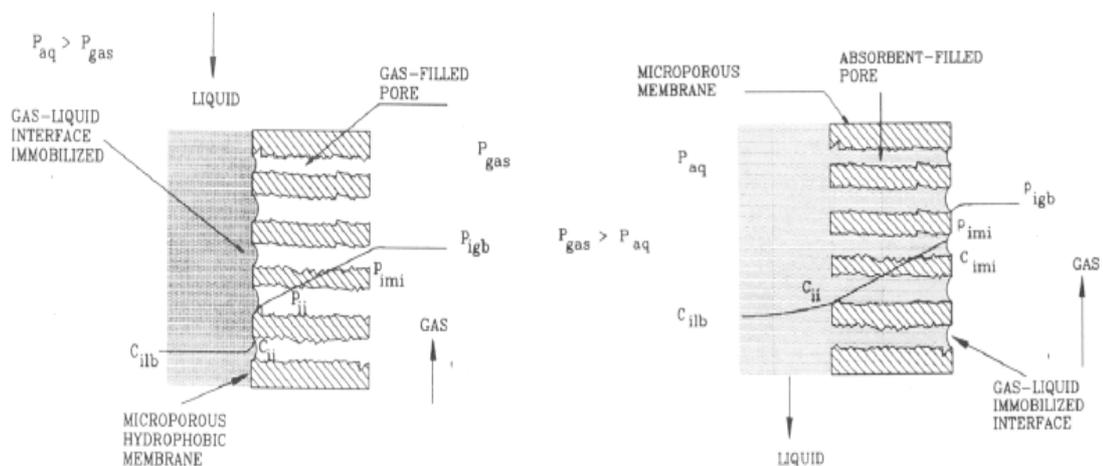


Fig. 14 Représentation schématique du comportement de la phase liquide et de la phase gaz à l'interface d'un contacteur à membrane. A : cas d'une membrane hydrophobe, exemple d'un contact non mouillant. B : exemple d'un contact mouillant (Karoo et Sirkar, 1993).

Les membranes contacteurs air/liquide ont d'abord été utilisées pour l'oxygénation du sang (Khoshbin *et al.*, 2005). Des études récentes témoignent de la diversité des applications possibles de ce procédé. Il a été utilisé dans l'oxygénation sans bulles des cultures de cellules animales (Schneider *et al.*, 1995), la production d'eau ultra-pure pour l'industrie des semi-conducteurs ou pour le traitement des eaux usées (Brindle et Stephenson, 1996; Pankhania *et al.*, 1999; Khoshbin *et al.*, 2005; Lesage *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006), l'absorption de gaz et notamment du  $\text{CO}_2$  (Wang *et al.*, 2005), mais n'a jamais été utilisé pour la production de biosurfactants.

On citera notamment pour les contacteurs air/liquide à membrane, les membranes de fibres creuses en polyéthersulfone ou en polypropylène, de taille de pores de 0,01 à 1 µm. Cette technologie permet donc de réaliser le transfert d'un gaz sans former de bulles dans la phase liquide, ce qui dans le cas d'une production de biosurfactants présenterait l'avantage d'éviter la formation de mousse.

### 1.7. L'EXTRACTION ET LA PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES DE *B. SUBTILIS*

Les techniques d'extraction ou de récupération ainsi que de purification des lipopeptides de *B. subtilis* à partir du bouillon de culture ont fait l'objet de nombreuses études, notamment sur la surfactine. Les plus anciennes consistent en une précipitation acide de la surfactine suivie d'une extraction avec des solvants organiques (Arima *et al.*, 1968). Au cours de ces dernières années, dans le but de développer des procédés plus propres écologiquement, d'autres techniques ont été étudiées ; par exemple l'extraction par moussage excessif qui, comme nous l'avons précédemment vu, conduit à l'extraction de quasiment la totalité des lipopeptides (Davis *et al.*, 2001; Guez *et al.*, 2007) mais elle est difficilement industrialisable.

Les techniques les plus intéressantes reposent sur les propriétés physico-chimiques des biosurfactants comme la surfactine. C'est ainsi que des études récentes ont porté sur l'adsorption de la surfactine (Ishigami *et al.*, 1995) sur différents types de supports afin de retirer celle-ci du milieu de culture grâce à une colonne d'adsorption couplée à un bioréacteur (Liu *et al.*, 2007; Chen et Juang, 2007; Montastruc *et al.*, 2008). Par ailleurs, les monomères de molécules amphiphiles, comme les biosurfactants à des concentrations au-dessus de leur CMC, peuvent s'associer pour former des structures supramoléculaires telles que des micelles avec des diamètres nominaux jusqu'à 2-3 fois plus grands que celui d'une molécule libre non associée (Osman *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 1999b). C'est à partir de ce constat que de nombreux auteurs ont étudié la purification des lipopeptides par ultrafiltration (UF) sur des membranes ayant un seuil de coupure (MWCO) suffisamment petit pour ne pas laisser passer les micelles de surfactine ; la surfactine se comporte alors comme le sodium-dodécyle-sulfate (Majewska-Nowak *et al.*, 2005).

Ce procédé d'extraction des molécules peut être réalisé en une ou deux étapes, ce qui permet de concentrer de 85% à 95% des molécules en fonction de la membrane utilisée. Après addition de solvant déstructurant les micelles de surfactine, le taux de récupération de surfactine est de plus de 85% avec une pureté de plus de 75% (Sen et Swaminathan, 2005; Isa *et al.*, 2007; Chen et Juang, 2008). Ce procédé engendre la concentration des molécules dans le rétentat qui s'agrègent alors sous forme de micelles ou de supra-structures allant de 9 à 100 nm de diamètre. Les caractéristiques de la filtration et leurs effets sur la récupération et la pureté de la surfactine ont été évalués au moyen d'une agitation périphérique de cellules (Sen et Swaminathan, 2005; Isa *et al.*, 2007).

Enfin une combinaison hybride d'une précipitation acide ou d'un ajout de sels et d'une étape d'ultrafiltration peut être entreprise pour apporter un taux de purification élevé (Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008b). L'extraction de la surfactine peut être aussi réalisée au moyen d'un contacteur à membrane liquide/solvant, mais est limitée par l'adsorption de celle-ci sur la membrane (Chen et Juang, 2007). Toutes ces différentes techniques présentent des résultats satisfaisants en matière de récupération et de purification de la surfactine mais n'ont jamais été réalisées en continu lors d'une production de biosurfactants, ceci à cause de la formation de mousse, qui en plus de ne pas pouvoir être filtrée, emporte avec elle la quasi-totalité des biosurfactants contenus dans le bouillon de culture.

## 2. SITUATION ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les lipopeptides produits par *B. subtilis* selon le mécanisme NRPS représentent une source naturelle de molécules à large spectre d'activités et ont suscité un intérêt croissant ces dernières années. C'est notamment le cas de la surfactine qui est le plus puissant tensioactif connu ou de la fengycine, un antifongique très actif. Néanmoins leur production à grande échelle est rendue particulièrement difficile à cause du fort moussage engendré par la combinaison de leurs propriétés tensioactives, de l'agitation et de l'aération par bullage d'air, qui sont nécessaires à l'apport d'oxygène pour la croissance des cellules. Dès lors, la seule technique d'extraction fiable des lipopeptides est ce moussage qui entraîne alors la quasi-totalité des lipopeptides produits. Mais cette technique n'est pas transférable à l'échelle industrielle.

L'étude portera donc, dans un premier temps, sur la mise en œuvre d'un système d'oxygénation du milieu sans la formation de bulles afin d'optimiser la production de lipopeptides. Pour ce faire la technologie du bioréacteur couplé à un contacteur à membrane air-liquide en fibres creuses sera développée et étudiée pour la première fois pour la production de lipopeptides par *B. subtilis* ATCC 21332. L'oxygénation du milieu se faisant grâce au transfert de l'oxygène par diffusion sans bulles dans le milieu de culture. L'influence de la composition des fibres creuses et de leur taille de pores sur la production de lipopeptides et sur le comportement de ces derniers à l'interface air-liquide sera étudiée.

Ce système servira par la suite de base à la réalisation d'un procédé intégré de production, d'extraction et de purification en continu des lipopeptides de *B. subtilis*. Ce procédé sera réalisé grâce au couplage du bioréacteur à un contacteur air-liquide à membrane avec un procédé intégré de microfiltration et d'ultrafiltration. Le comportement des lipopeptides à l'interface des membranes de filtration sera aussi étudié.

La mise en œuvre de la souche *B. subtilis* ATCC 21332 dans ces bioréacteurs à membranes ayant fait apparaître la synthèse de surfactine et de fengycine, une approche de génie génétique sera entreprise à partir de la souche *B. subtilis* 168, dont le génome est entièrement séquencé, afin de construire une souche mono-productrice d'un lipopeptide, la surfactine.

Ainsi que cela a été mentionné dans la synthèse bibliographique, la souche *B. subtilis* 168 possède les opérons *surfA* et *pps*, ce qui lui donne le potentiel pour produire la surfactine et la plipastatine mais son gène *sfp* code pour une protéine non fonctionnelle rendant la production de ces deux lipopeptides impossible. De plus, la production de la surfactine chez *B. subtilis* est au cœur d'un système complexe de régulation ayant de nombreuses cibles dans la cellule, ce qui rend cette synthèse dépendante de nombreux facteurs environnementaux ou de la composition du milieu de culture. Les objectifs de cette partie du travail se déclinent donc en trois grandes parties.

Tout d'abord, le rétablissement d'une phosphopantéthéine transférase fonctionnelle sera au préalable effectué chez cette souche afin de permettre la synthèse NRPS de lipopeptides. Le promoteur natif de la surfactine synthétase sera ensuite remplacé par un promoteur fort et constitutif afin de s'affranchir du mécanisme complexe de régulation. Enfin, la synthèse de plipastatine sera interrompue afin d'obtenir une souche uniquement productrice de surfactine. Les effets de ces modifications génétiques sur la production de surfactine, sur l'expression de certains gènes et sur les propriétés phénotypiques de *B. subtilis* seront étudiés.

En définitif, la souche dérivée de ces différentes modifications génétiques sera utilisée pour la production, l'extraction et la purification en continu de la surfactine dans le procédé intégré précédemment étudié.

---

# **CHAPITRE II :**

# **MATERIELS ET METHODES**

## 1. SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES

Les travaux de biologie moléculaire réalisés dans ces travaux ont donné lieu à l'utilisation et à la construction de nombreuses souches d'*Escherichia coli*, de *B. subtilis*, ainsi que de plasmides. Les souches d'*E. coli* utilisées et/ou construites dans ce travail sont répertoriées dans le Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 Souches d'*E. coli* utilisées et construites dans ce travail

Souches	Plasmides portés et résistance <sup>1</sup>	Référence ou source
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> Δ ( <i>lac-proAB</i> ) / F' [ <i>traD36</i> , <i>proAB</i> <sup>+</sup> , <i>lacI<sub>q</sub></i> , <i>lacZΔM15</i> ]	Promega, Madison, USA
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2</i> Δ ( <i>argF-lacZ</i> ) U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ80 Δ ( <i>lacZ</i> ) M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	Stock du laboratoire
<i>E. coli</i> EBG106	pBG106; Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	(Leclere <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i> EBG108	pDG1661; Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Stock du laboratoire
<i>E. coli</i> EBG145	pBG148; Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG145B	pBG148B; Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG121	pBG115; Ap <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG125	pBG128; Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG134	pBG129; Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG126	pBG120; Ap <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de DH5α)
<i>E. coli</i> EBG127	pBG123; Ap <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG127B	pBG123B; Ap <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de DH5α)
<i>E. coli</i> EBG132	pBG124; Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG132B	pBG124B; Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de DH5α)
<i>E. coli</i> EBG128	pBG127; Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG133	pBG133; Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG133B	pBG133B; Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG143	pBG146; Ap <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG146	pBG149; Ap <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)
<i>E. coli</i> EBG142	pBG145; Ap <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail (dérivée de JM109)

<sup>1</sup> Ap<sup>R</sup>, résistance à l'ampicilline; Nm<sup>R</sup>, résistance à la néomycine; Cm<sup>R</sup>, résistance au chloramphénicol; Spc<sup>R</sup>, résistance à la spectinomycine.

Les outils plasmidiques utilisés et/ou construits dans ce travail sont répertoriés dans le Tableau 3, les cartes de restriction des plasmides d'origine sont présentées dans les Fig. 15 et Fig. 16, page 62 et leurs plasmides dérivés en annexe II.

Tableau 3 Plasmides utilisés dans ce travail

Plasmides	Description des plasmides <sup>1</sup>	Référence ou source
pGEM-T Easy	Vecteur de clonage, Ap <sup>R</sup>	Promega
pDG1661	Vecteur d'intégration, <i>spoVG-lacZ</i> Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	(Guerout-Fleury <i>et al.</i> , 1996)
pBG106	Fragm <sup>t</sup> P <sub>repU</sub> - <i>neo</i> , Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	(Leclère <i>et al.</i> , 2005)
pBG115	Fragm <sup>t</sup> PCR <i>sfp</i> de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 cloné dans pGEM-T Easy, Ap <sup>R</sup>	Ce travail
pBG120	Fragm <sup>t</sup> PCR <i>hxlR</i> cloné dans pGEM-T Easy, Ap <sup>R</sup>	Ce travail
pBG123	Fragm <sup>t</sup> PCR <i>HaeIII-srfAA</i> cloné dans pGEM-T Easy, Ap <sup>R</sup>	Ce travail
pBG123B	Fragm <sup>t</sup> PCR <i>srfAA</i> cloné dans pGEM-T Easy, Ap <sup>R</sup>	Ce travail
pBG124	Fragm <sup>t</sup> de 1,1 kb <i>EcoRI HaeIII-srfA-A</i> de pBG123 inséré dans pBG106, Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail
pBG124B	Fragm <sup>t</sup> de 1 kb <i>EcoRI srfA-A</i> de pBG123B inséré dans pBG106, Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail
pBG127	Fragm <sup>t</sup> de 0,7 kb <i>Sall-SphI hxlR</i> inséré dans pBG106, Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail
pBG128	pDG1661 délété par <i>PvuII</i> et religaturé, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail
pBG129	Fragm <sup>t</sup> de 1,1 kb <i>EcoRI sfp</i> de pBG115 inséré dans le site <i>EcoRI</i> de pBG128	Ce travail
pBG133	Fragm <sup>t</sup> <i>SphI-BglIII hxlR</i> de pBG127 ligaturé avec le fragm <sup>t</sup> <i>SphI-BglIII HaeIII-srfAA</i> de pBG124, Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail
pBG133B	Fragm <sup>t</sup> <i>SphI-BglIII hxlR</i> de pBG127 ligaturé avec le fragm <sup>t</sup> <i>SphI-BglIII srfAA</i> de pBG124B, Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup>	Ce travail
pBG145	Fragm <sup>t</sup> <i>spoIIIA::spc</i> cloné dans pGEM-T Easy, Ap <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail
pBG148B	Fragm <sup>t</sup> <i>EcoRI P<sub>srfA</sub></i> ligaturé dans le site <i>EcoRI</i> de pDG1661, Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail
pBG146	Fragm <sup>t</sup> de 6,5 kb <i>ppsA</i> généré par PCR et cloné dans pGEM-T Easy, Ap <sup>R</sup>	Ce travail
pBG148	Fragm <sup>t</sup> <i>EcoRI</i> de pBG106 ligaturé dans le site <i>EcoRI</i> de pDG1661, Ap <sup>R</sup> , Nm <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail
pBG149	Fragm <sup>t</sup> <i>NarI-XhoI spc</i> de pDG1661 ligaturé avec les sites <i>NarI-XhoI</i> de pBG146, Ap <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup>	Ce travail

<sup>1</sup> Ap<sup>R</sup>, résistance à l'ampicilline; Nm<sup>R</sup>, résistance à la néomycine; Cm<sup>R</sup>, résistance au chloramphénicol; Spc<sup>R</sup>, résistance à la spectinomycine; Fragm<sup>t</sup>, fragment.

Enfin les souches de *B. subtilis* utilisées et/ou construites dans ce travail sont répertoriées dans le Tableau 4.

Tableau 4 Souches de *B. subtilis* utilisées et construites dans ce travail

Souches	Génotype <sup>1</sup>	Référence ou source
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2, sfp</i> <sup>0</sup>	Stock du laboratoire
<i>B. subtilis</i> BBG111	<i>trpC2, amyE::sfp-cat</i>	Ce travail (dérivée de 168)
<i>B. subtilis</i> BBG113	<i>trpC2, amyE::sfp-cat, P<sub>repU</sub>-neo::HaeIII-srfA</i>	Ce travail (dérivée de BBG111)
<i>B. subtilis</i> BBG113B	<i>trpC2, amyE::sfp-cat, P<sub>repU</sub>-neo::srfA</i>	Ce travail (dérivée de BBG111)
<i>B. subtilis</i> BBG118	<i>trpC2, P<sub>repU</sub>-neo::HaeIII-srfA</i>	Ce travail (dérivée de 168)
<i>B. subtilis</i> BBG118B	<i>trpC2, P<sub>repU</sub>-neo::srfA</i>	Ce travail (dérivée de 168)
<i>B. subtilis</i> BBG119	<i>trpC2, amyE::sfp-cat; spoIIIA ::spc</i>	Ce travail (dérivée de BBG111)
<i>B. subtilis</i> BBG120	<i>trpC2, amyE::sfp-cat; P<sub>repU</sub>-neo::srfA spoIIIA ::spc</i>	Ce travail (dérivée de BBG113B)
<i>B. subtilis</i> BBG127	<i>trpC2, amyE::P<sub>srfA</sub>-lacZ cat</i>	Ce travail (dérivée de 168)
<i>B. subtilis</i> BBG128	<i>trpC2, amyE::P<sub>repU</sub>-neo-lacZ cat</i>	Ce travail (dérivée de 168)
<i>B. subtilis</i> BBG130	<i>trpC2, amyE::sfp-cat, ppsA::spc</i>	Ce travail (dérivée de BBG111)
<i>B. subtilis</i> BBG131	<i>trpC2, amyE::sfp-cat, P<sub>repU</sub>-neo::HaeIII-srfA, ppsA::spc</i>	Ce travail (dérivée de BBG113)
<i>B. subtilis</i> BBG131B	<i>trpC2, amyE::sfp-cat, P<sub>repU</sub>-neo::srfA, ppsA::spc</i>	Ce travail (dérivée de BBG113B)
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332		Stock du laboratoire <sup>2</sup>
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Souche sauvage	Stock du laboratoire <sup>2</sup>
	Souche sauvage	

<sup>1</sup> Ap<sup>R</sup>, résistance à l'ampicilline; Nm<sup>R</sup>, résistance à la néomycine; Cm<sup>R</sup>, résistance au chloramphenicol; Spc<sup>R</sup>, résistance à la spectinomycine. <sup>2</sup> Bacillus Genetic Stock Center.

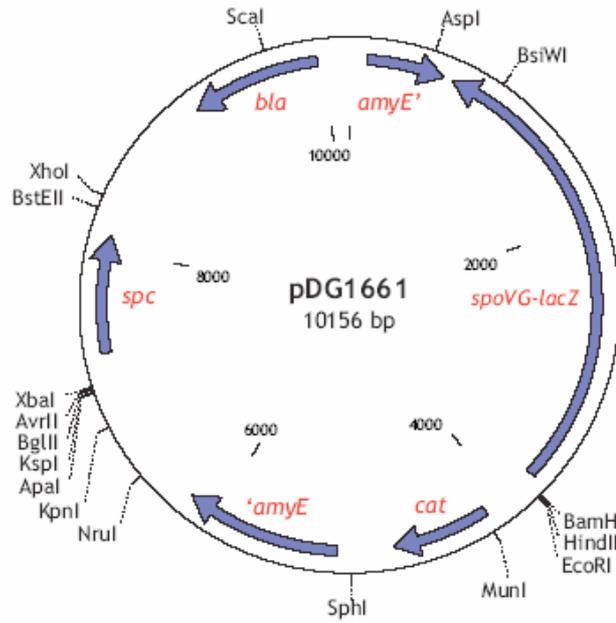


Fig. 15 Carte du plasmide d'intégration pDG1661,  $Ap^R$ ,  $Cm^R$ ,  $Spc^R$ , *spoVG-lacZ*

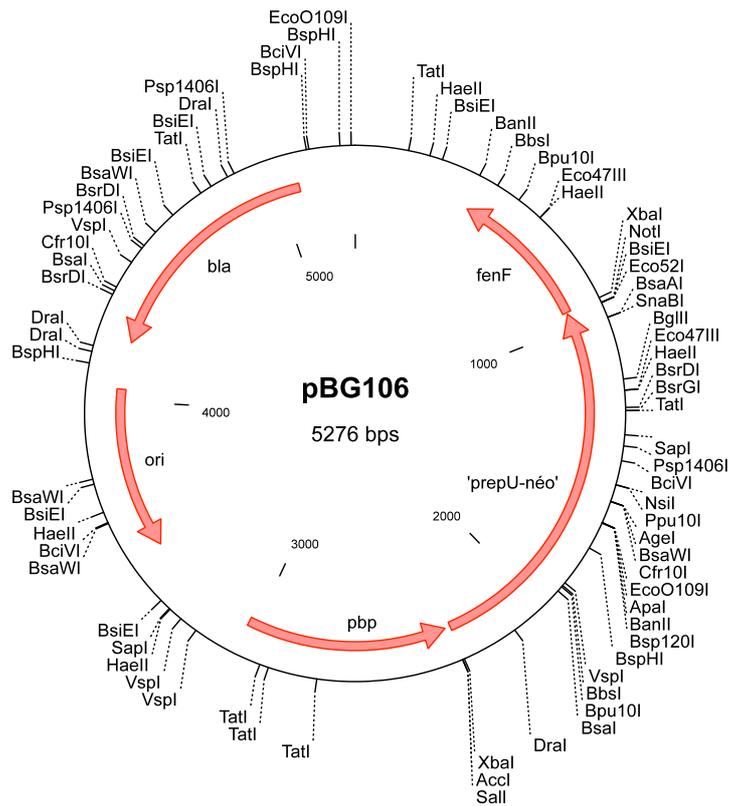


Fig. 16 Carte de restriction du plasmide pBG106,  $Ap^R$ ,  $Nm^R$

## 2. LES MILIEUX DE CULTURE

### 2.1. LE MILIEU DE LANDY

#### 2.1.1. Composition

La composition de ce milieu a été définie en 1948 par Landy : glucose, 20 g/L; acide glutamique, 5 g/L; extrait de levure, 1 g/L,  $K_2HPO_4$ , 1 g/L;  $MgSO_4$ , 0,5 g/L; KCl, 0,5 g/L;  $CuSO_4$ , 1,6 mg/L;  $Fe_2(SO_4)_3$ , 1,2 mg/L;  $MnSO_4$ , 0,4 mg/L. Le pH est ajusté à 7,0 avec une solution de KOH 3M stérile. Il peut être complété par des acides aminés spécifiques de l'auxotrophie de la souche si nécessaire. Il peut être aussi tamponné par de l'acide 3-[N-morpholino]-propane sulfonique (MOPS) 0,1M, préalablement stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,2  $\mu m$  de porosité.

#### 2.1.2. Solutions stocks

Pour assurer une reproductibilité de la composition du milieu, des solutions concentrées stériles sont réalisées.

La solution G contenant du glucose 20 X (400 g/L) et de l'acide glutamique 20 X (100 g/L), est ajustée à pH 8 par une solution de KOH 5 M et stérilisée par filtration à travers une membrane de porosité de 0,2  $\mu m$ .

La solution E contenant de l'extrait de levure 20X (20 g/L) et du  $MgSO_4 (7H_2O)$  20X (10 g/L) est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 20 min.

La solution K contenant les sels de potassium 20X ( $K_2HPO_4$ , 20 g/L; KCl, 10 g/L) est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 20 min.

La solution O contenant les oligoéléments 20X ( $CuSO_4$ , 32 mg/L ;  $Fe_2(SO_4)_3$ , 24 mg/L ;  $MnSO_4$ , 8 mg/L) est acidifiée par du  $H_2SO_4$  concentré à pH=1,8 et est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 20 min.

La reconstitution d'un litre de milieu de Landy est donc réalisée en ajoutant 50 mL de chaque solution concentrée et 800 mL d'eau distillée stérile.

## 2.2. LE MILIEU B

La réalisation d'un litre de milieu B nécessite la préparation préalable d'une solution de base, et d'une solution de complément ainsi que cinq autres solutions. Ces solutions seront mélangées de manière stérile (au bec Bunsen ou sous une hotte à flux laminaire) pour l'obtention du milieu fini. La composition des ces solutions est la suivante :

- La solution de base :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  15 mM, 2g/L;  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$  8 mM, 2g/L; KCl 27 mM, 2g/L; citrate de Na 7 mM, 2g/L, pour un litre; 100 mL de Tris-HCl 50 mM sont ajoutés.

- La solution de complément 100 X ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 8,1g/L;  $\text{FeSO}_4$ , 0,04 g/L;  $\text{MnSO}_4$ , 0,169 g/L).

- La solution de  $\text{CaCl}_2$  500 X (0,1M). Ces trois solutions sont stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

- La solution de glucose 20 X (20g/L).

- La solution d'acide glutamique 1,5 M (220g/L) est ajustée à pH 8 par une solution de KOH 5 M.

- La solution de tryptophane 0,39 M (79,5 g/L) est préparée en ajoutant quelques gouttes d'une solution de KOH 5 M jusqu'à dissolution totale du tryptophane.

- La solution de lysine 0,43 M (78,5 g/L). Ces quatre dernières solutions sont stérilisées par filtration à travers une membrane de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité.

Un litre de solution B est alors préparé en complétant la solution de base par 10 mL de solution complément, 2 mL de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mL de glucose, 3 mL d'acide glutamique, 2 mL de tryptophane, 2 mL de lysine. Le pH est ajusté à 7 avec une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M stérile.

Le milieu B est le plus souvent utilisé sous forme gélosée pour réaliser le test de swarming (capacité à coloniser un milieu) ; 7g/L d'agar sont donc ajoutés à la solution de base (Julkowska *et al.*, 2005; Leclère *et al.*, 2006).

### 2.3. LES MILIEUX STERLINI-MANDELSTAM

Les milieux définis par Sterlini & Mandelstam (Sterlini et Mandelstam, 1969), sont utilisés pour le test de sporulation. Deux milieux sont utilisés, un milieu dit riche et un milieu dit pauvre. La composition du milieu riche est la suivante : hydrolysate acide de caséine, 8,6 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,36 g/L;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,107 g/L;  $\text{FeCl}_3 (6\text{H}_2\text{O})$ , 0,6 mg/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,535 g/L;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,096 g/L;  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ , 0,0986 g/L,  $\text{CaCl}_2 (6\text{H}_2\text{O})$ , 0,02 g/l;  $\text{MnSO}_4 (4\text{H}_2\text{O})$ , 0,022 g/L. Acide glutamique, 3,16 g/L; Alanine, 2,14 g/L; Asparagine, 1,2 g/L; Tryptophane, 0,02 g/L.

Tous ces éléments sont préparés séparément sous forme de solutions concentrées 20X et stérilisés par autoclavage à 121°C durant 20 min, sauf pour les solutions d'acides aminés qui sont filtrées à travers une membrane de 0,2 µm de porosité. La solution de  $\text{FeCl}_3 (6\text{H}_2\text{O})$  20 X est acidifiée avant stérilisation par du  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré jusqu'à pH=1,8. Un litre de milieu riche est reconstitué à partir de ces différentes solutions et en ajustant le volume avec 350 mL d'eau distillée stérile. Le pH est ensuite ajusté à 7,1 avec une solution de KOH 5 M.

La composition du milieu pauvre est la suivante :  $\text{FeCl}_2$ , 0,046 mg/L;  $\text{MgSO}_4$ , 4,8 g/L;  $\text{MnCl}_2$ , 12,6 mg/L;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 535 mg/L;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 106 mg/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 68 mg/L;  $\text{NH}_4\text{PO}_3$ , 96,5 mg/L;  $\text{CaCl}_2$ , 919 mg/L; Acide glutamique, 2 g/L; Tryptophane, 0,02 g/L. Tous ces éléments sont préparés séparément sous forme de solutions concentrées 20X et stérilisés par autoclavage à 121°C durant 20 min, sauf pour les solutions d'acides aminés qui sont filtrées à travers une membrane de 0,2 µm de porosité. La solution de  $\text{FeCl}_2 (6\text{H}_2\text{O})$  20X est acidifiée avant stérilisation par de l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré jusqu'à pH=1,8. Un litre de milieu pauvre est reconstitué à partir de ces différentes solutions et en ajustant le volume avec 500 mL d'eau distillée stérile. Le pH est ensuite ajusté à 7,1 avec une solution de KOH 5 M.

### 2.4. LES AUTRES MILIEUX DE CULTURE : LB, MSI, SOC

D'autres milieux ont été utilisés lors des travaux de biologie moléculaire (Sambrook et Russel, 2001). Des milieux très nutritifs qui favorisent la croissance de la souche comme le milieu Luria-Bertani (LB) et le milieu SOC ont été régulièrement utilisés. D'autres sont spécifiques à une méthode. Les compositions de ces milieux sont les suivantes :

Milieu LB : Tryptone, 10 g/L ; Extrait de levure, 5 g/L; NaCl, 10 g/L; pH 7,2. Le milieu LB peut être gélosé, de l'agar est alors ajouté à 17 g/L. Stérilisation par autoclavage à 121°C durant 20 min.

Milieu SOB : Tryptone, 20 g/L; Extrait de levure, 5 g/L; NaCl, 0,5 g/L; KCl, 18,6 g/L; pH 7,2. Stérilisation par autoclavage à 121°C durant 20 min.

Milieu SOC : ce milieu est semblable au milieu SOB. Pour obtenir le SOC, il suffit d'ajouter stérilement, après autoclavage du milieu SOB, 0,5 mL de MgCl<sub>2</sub> 2M stérile et 2 mL de glucose 1 M stérile.

Milieu PDA : c'est un milieu gélosé utilisé pour la culture des moisissures. Sa composition est la suivante : Extrait de pomme de terre; 4 g/L, Glucose; 20 g/L, Agar-agar, 15 g/L; pH 7,0. Stérilisation par autoclavage à 121°C durant 20 min.

Milieu Spizizen Minimum Salts: ce milieu est utilisé pour réaliser des dilutions des cultures bactériennes lors du test de sporulation. La réalisation d'un litre de ce milieu nécessite la préparation préalable de trois solutions. Ces solutions sont mélangées stérilement pour l'obtention du milieu fini.

La composition de la solution de base est la suivante: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g/L; citrate de Na (2H<sub>2</sub>O), 1 g/L; MgSO<sub>4</sub> (2H<sub>2</sub>O), 0,2 g/L. Cette solution est réalisée avec 980 mL d'eau distillée, et ajustée à pH 7,0 avec une solution de KOH 5 M. Elle est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 20 min. Une fois la solution de base refroidie, 10 mL d'une solution de glucose à 500 g/L et 10 mL d'une solution de tryptophane à 5 g/L sont ajoutés après avoir été préalablement stérilisés par filtration à travers une membrane de 0,2 µm de porosité.

Milieu chimiquement défini : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,98 g/L; Citrate de Na (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>a3</sub>O<sub>7</sub>), 0,87 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.(3H<sub>2</sub>O), 18,24 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5,96 g/L; Glucose, 0,5 g/L; pH 7,2. Ce milieu est stérilisé par autoclavage à 110°C durant 20 min.

Lorsque le milieu est gélosé, la préparation se fait en 2 étapes distinctes afin d'éviter une complexation de l'agar-agar par les sels de phosphate. La composition du milieu est concentrée 2 fois dans un premier flacon.

Un autre flacon d'agar concentré 2 fois est également préparé. Lorsque ceux-ci sont autoclavés, le mélange des 2 flacons est effectué. Du tryptophane à 16 mg/L peut être ajouté après avoir été stérilisé par filtration à travers une membrane de 0,2 µm de porosité.

Milieu MS1 : Ce milieu est utilisé lors d'une transformation par compétence naturelle. Il est réalisé à partir du milieu chimiquement défini : à 10 mL de milieu chimiquement défini, il faut ajouter : 100 µL de glucose, 500 g/L; 40 µL d'hydrolysate acide de caséine, 50 g/L; 200 µL d'extrait de levure, 50 g/L; 6,7 µL de MgSO<sub>4</sub>, 1 M; 50 µL de tryptophane, 50 mM ; pH 7,2. Toutes ces solutions sont préparées séparément et stérilisées par autoclavage à 121°C durant 20 min sauf pour les solutions de glucose et de tryptophane qui sont filtrées à travers une membrane de 0,2 µm de porosité.

Milieu MS2 : Ce milieu est utilisé lors de la deuxième étape d'une transformation par compétence naturelle, il est réalisé à partir du milieu MS1 : à 10 mL de milieu MS1, ajouter : 50 µL de CaCl<sub>2</sub>, 50 mM et 25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 M. Ces solutions sont préparées séparément et stérilisées par autoclavage à 121°C durant 20 min.

## 2.5. LES MARQUEURS DE SELECTION ANTIBIOTIQUES

En fonction de la souche utilisée et de la résistance de celle-ci à certains antibiotiques, dans les milieux décrits ci-dessus peuvent être ajoutés des antibiotiques (Sigma-Aldrich). Les plus couramment utilisés sont l'ampicilline (Ap ; 50µg/mL), la néomycine (Nm ; 20µg/mL), le chloramphénicol (Cm ; 5 µg/mL) et la spectinomycine (Spc ; 100 µg/mL). Ces solutions sont préparées puis filtrées à travers une membrane de 0,2 µm de porosité.

### 3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### 3.1. EXTRACTION D'ADNG

Les extractions d'ADNg sont réalisées grâce au kit Promega « Wizard® Genomic DNA Purification Kit » (Promega, Madison, U.S.A.) selon le protocole fourni par le fabricant.

#### 3.2. LA POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

La réaction en chaîne par polymérase (PCR est l'abréviation anglophone) est une méthode d'amplification génique *in vitro*, qui permet de copier en grand nombre une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique et d'oligonucléotides (amorces) spécifiques à la séquence à amplifier.

Ces oligonucléotides sont élaborés à l'aide du logiciel Primer 3 à partir des séquences publiées du génome de *B. subtilis* 168 (PubMed Gene NC\_000964.2). Ces oligonucléotides sont fabriqués par Eurogentec (Angers, France). L'ensemble de ceux-ci est listé dans le Tableau 5, page 68 et le Tableau 6, page 69, en fonction de l'application dans laquelle ils ont été utilisés.

Tableau 5 Amorces PCR utilisées pour les constructions génétiques

Amorces	Tm (°C)	Séquence des amorces
<i>P<sub>srfA</sub></i> sens		5'-GACAAAAATGTCATGAAAGAATCG-3'
<i>P<sub>srfA</sub></i> antisens	58°C	5'-GGGTAAAAAGTTATTTCCATATTGTC-3'
<i>sfp</i> sens		5'-CTGCCTGAATTATGCTGTGG-3'
<i>sfp</i> antisens	55°C	5'-TCGCTGAGGCTACATCAAG-3'
<i>hxlRI</i> sens		5'-CTTCCGGGATGTTGACGAGGTC-3'
<i>hxlRI</i> antisens	52°C	5'-AAAGACACCCTTGCGAAGAGCG-3'
<i>srfAAI</i> sens		5'-AAGATTAGGGGAGGTATGAC-3'
<i>srfAAIB</i> sens	55°C	5'-TTTAATAGCGGCCATCTG-3'
<i>srfAAI</i> antisens		5'-GAAGTGTCTTCATCAGATCC-3'
<i>ppsAI</i> sens		5'-CTGGAGGGAATCCGTTGAG-3'
<i>ppsAI</i> antisens	61°C	5'-TACTGTACCGGCAAACC-3'

Le protocole utilisé pour l'amplification est standard, seule la température d'hybridation varie selon le  $T_m$  (température de demi-dénaturation) calculé à partir du logiciel Primer 3 lors de la détermination des amorces. L'appareil de PCR utilisé est le « Eppendorf Mastercycler Personal » (Eppendorf, Hamburg, Allemagne). Les PCR ont été réalisées avec la Taq ADN polymérase « Arrow » (5 U/ $\mu$ L) de MP Biomedicals (Illkrich, France). L'amplification est réalisée en procédant au mélange suivant : 5  $\mu$ L d'ADNg à environ 100 ng/mL, 5  $\mu$ L de tampon Taq, 1  $\mu$ L de dNTPs 100  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ L de chaque amorce (sens et antisens) 20  $\mu$ M (Eurogentec), 0,4  $\mu$ L de Taq polymérase, qsp 50  $\mu$ L avec H<sub>2</sub>O, exempt de nucléase. Le programme PCR utilisé consiste en 2 min de dénaturation à 90°C, puis 30 s de dénaturation à 90°C, 1 min à la température d'hybridation, 2 min d'élongation à 72°C, ces trois dernières étapes étant répétées sur 29 cycles et enfin 5 min d'élongation finale à 72°C.

Tableau 6 Amorces PCR utilisées pour les vérifications des constructions

<i>amyE</i> sens		5'-CTTCGGTATGTGATTGTGAAGC-3'
<i>amyE</i> antisens	60°C	5'-GCAGACAATATCAGCATCCTTG-3'
<i>hxlR2</i> sens		5'-CTGCGCCTTTAATCGTTGC-3'
<i>srfAA2</i> antisens	54°C	5'-CGTCATGTCCTTACGGTAGCTC-3'
<i>P<sub>repU-neo</sub></i> sens		5'-CGCGAATTCGATTAAGATTAGG-3'
<i>srfAA3</i> antisens	60°C	5'-TCCTTCATCCGGTCTTTGAC-3'
<i>spc1</i> sens		5'-TATATACGGTGAGTGGCTCAGG-3'
<i>ppsA2</i> antisens	60°C	5'-GATATGCTGCAGCTAAATCCTC-3'
<i>accb</i> sens	55°C	5'-TCAATTGCTTTAATCAGCTCGTG-3'
<i>efp</i> antisens		5'-TCAATACATCAGACGGTTCTTACG-3'

### 3.3. QUANTIFICATION DES ARN TOTAUX CHEZ *B. SUBTILIS*

#### 3.3.1. Le blocage du transcriptome

Le blocage du transcriptome est une opération délicate, réalisée sur les cultures de *B. subtilis* grâce au kit Ambion « Ribo-Pure Bacteria<sup>®</sup> » (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.). Des échantillons sont réalisés sur des cultures de *B. subtilis* 168 et de ses dérivés à différents âges de la culture. Dans le but de bloquer le transcriptome, un volume de culture correspondant à  $5 \times 10^8$  cellules est prélevé après 4, 6 et 7 générations, ainsi qu'après 24 h de culture.

L'échantillon est traité par une solution saline de RNALater (Ambion) (v/v) dans un tube Eppendorf ou Falcon traité par rayonnement contre les RNases. Après passage au vortex pendant 10 s et centrifugation pendant 10 min à  $11\,000 \times g$  à  $-9^{\circ}\text{C}$ , le surnageant est éliminé et le culot est repris par 0,5 mL de solution RNALater. Les culots sont placés 24 h à  $4^{\circ}\text{C}$  puis sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2. L'extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux (Guez *et al.*, 2008) est réalisée à partir des culots bactériens obtenus au § 3.3.1 (page 69). Les cellules, conservées dans 0,5 mL de RNALater sont centrifugées 1 min à  $12\,000 \times g$  puis remises en suspension dans 350  $\mu\text{L}$  d'une solution de RNAWiz qui contient du phénol (Ambion). Ceci permet la fragilisation des cellules, la dissolution des composants cellulaires, l'inhibition des RNases et la stabilisation des ARN. Ensuite, les cellules sont transférées dans un tube contenant 250  $\mu\text{L}$  de billes de zirconium puis lysées par passage au Mixer1000 pendant 10 min. Le lysat est centrifugé 5 min à  $12\,000 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$ , puis les billes de zirconium sont éliminées. Du chloroforme (0,2 vol) est ajouté au lysat cellulaire et le mélange est incubé 10 min à température ambiante. Après centrifugation 5 min à  $12\,000 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$ , la phase aqueuse est récupérée et de l'éthanol 100 % est ajouté (0,5 vol). L'ARN est purifié par passage de la solution à travers une colonne de silice fournie dans kit Ambion, puis par lavage avec 700  $\mu\text{L}$  de solution de lavage 1 et  $2 \times 250 \mu\text{L}$  de solution de lavage 2 et 3. Les ARNs sont élués par 50  $\mu\text{L}$  de la solution d'éluion préchauffée. Enfin, un traitement à la DNase I est réalisé et l'éluat est incubé 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le réactif d'inactivation de la DNase est alors ajouté à raison de 20% du volume. L'échantillon est mis à incuber 2 min à température ambiante, centrifugé 1 min à  $12\,000 \times g$  et finalement transféré dans un tube exempt de RNases. Les ARN totaux sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans de l'éthanol 95% à raison de 2,5 volumes d'éthanol pour un volume d'éluat.

A la fin de chaque extraction d'ARN, un contrôle de la quantité et de la qualité des ARN extraits est effectué. La concentration de matériel extrait est estimée par une mesure d'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.) mesurant les absorbances sur un volume d'échantillon de 1  $\mu\text{L}$ . L'évaluation de la contamination de l'échantillon par des protéines est effectuée par mesure du rapport d'absorbance 260/280 nm.

Un rapport supérieur ou égal à 2 est signe d'une très bonne qualité. L'évaluation de la contamination de l'échantillon par des solvants organiques, des sels et des protéines est effectuée par mesure du rapport d'absorbance 260/230 nm.

### 3.3.3. La transcription inverse

Les ARN totaux sont dans un premier temps précipités à l'aide d'une solution d'acétate de sodium 3M pendant 1 h à -20°C. Puis après une centrifugation à 4°C à 14000 × g pendant 20 min, le culot est lavé avec 200 µL d'éthanol 70%. L'ensemble est de nouveau centrifugé dans les conditions exposées ci-dessus. L'éthanol est alors éliminé et le culot est repris dans 20 µL d'eau pure exempte de RNase. Puis, 1 µL de l'éluat est récupéré afin de déterminer les concentrations en ARN totaux des échantillons à l'aide du spectrophotomètre ND-1000. Dix µg d'ARN totaux sont rétrotranscrits.

Le mélange réalisé pour la transcription inverse (volume final de 40 µL) a la composition suivante : tampon Pol 5X (Applied Biosystems); 0,1 pmole d'amorces spécifiques de *B. subtilis* 168 (Primer mix, Eurogentec) ; 3,3 mM de chacun des oligonucléotides dATP, dGTP, dTTP et dTTP (1 mM) ; 0,1 M de dithiothréitol (DTT) ; 1 µL de RNasin (Promega) et d'eau milli-Q exempte de RNase. Le tout est incubé à 65°C pendant 5 min, puis à 42°C pendant 5 min. 200 unités de polymérase superscript II (Applied Biosystems) sont ajoutées au mélange. L'ensemble est ensuite incubé à 42°C pendant une heure, puis 200 unités de polymérase superscript II sont à nouveau ajoutées.

L'incubation est renouvelée pendant 1 h. La transcription inverse est arrêtée par ajout de 20 µL d'une solution de NaOH 0,1 M contenant de l'EDTA 2 mM ; l'ensemble est mis à incuber à 65°C pendant 30 min. Le tout est neutralisé par 20 µL d'HCl 0,1 M. Les échantillons sont alors purifiés sur colonne à l'aide du kit «Qiaquick PCR purification » (Qiagen, Courtaboeuf, France). Enfin, de nouvelles mesures à 260 nm, 550 nm et 650 nm sont réalisées avec le NanoDrop ND-1000 dans le but de déterminer la quantité d'ADN complémentaire formée.

### 3.3.4. La quantification de l'expression d'un gène

A partir des ARN extraits et retrotranscrits précédemment, des PCR ont été réalisées avec des couples d'amorces sens et antisens spécifiques d'une partie du gène à quantifier (listées dans le Tableau 7, page 72).

Le mélange de PCR est réalisé avec les réactifs suivants : ADN, 0,5 µL; tampon 10X, 2,5 µL; dNTP (2,5 mM), 1 µL; MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,5 µL; amorce sens, 0,5 µL; amorce antisens, 0,5 µL; 25 µL H<sub>2</sub>O. 0,2 µL de Taq Gold (5U/µL, Applied Biosystems) sont ensuite ajoutés au mélange. Les conditions d'amplification ont été de 5 min à 94°C, suivi de 25 cycles de 30 s à 94°C, 30 s à 56°C, 60 s à 72°C et un cycle à 72°C pendant 5 min avant de conserver les produits PCR à 4°C. Les produits PCR sont alors déposés sur un gel d'agarose à 1,5%, et observés, après migration, sur un transilluminateur UV GelDoc et les bandes ont été quantifiées grâce à l'outil de quantification d'intensité du logiciel Quantity One Quantitation Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.).

Les intensités sont normalisées par rapport à celles obtenues avec les 330 pb amplifiées du gène *rplL* qui est un gène de structure chez *B. subtilis*, codant pour la protéine ribosomique L12.

Tableau 7 Amorces PCR utilisées pour la PCR comparative

<i>rplL</i> sens		5'-GCTTCCGTTAAAGAAGCAACTG-3'
<i>rplL</i> antisens	55°C	5'-AGAAGCGCCAACTTCTTCAA-3'
<i>srfAA</i> sens		5'-ACCCTTTAACGGATGCACAA-3'
<i>srfAA</i> antisens	50°C	5'-CCGGCTCCATTGTGAAATAA-3'
<i>comS</i> sens		5'-CGATCAGGCAAGCATCTTATC-3'
<i>comS</i> antisens	55°C	5'-CCCTCCAGCAGAAGTACAGC-3'
<i>comK</i> sens		5'-TGCAAATTGTCGACAGAAGC-3'
<i>comK</i> antisens	55°C	5'-CGCTCTTCTTTCGGGTACAG-3'

### 3.4. L'EXTRACTION DE PLASMIDES

#### 3.4.1. Utilisation de la technique du « boiling »

L'extraction des plasmides de cellules par la méthode de « boiling » (Holmes et Quigley, 1981) n'est pas une méthode très « propre » car elle a tendance à laisser des traces d'ADN chromosomique. Par contre, elle a l'avantage, contrairement aux kits fournis, d'être peu onéreuse. Cette méthode est utilisée lorsque le nombre de transformants à tester est supérieur à 10.

Cette technique nécessite l'utilisation d'une solution spécifique dont la composition est la suivante : Saccharose, 8%; Triton X-100, 0,5% ; EDTA, 50 mM ; Tris-HCl 10 mM pH 8. Cette solution de « boiling » est stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

Le protocole de la technique est le suivant : mettre dans un tube à centrifuger 5 mL de culture d'une nuit dans du LB+ATB et centrifuger 10 minutes à 10,000 × g, jeter le surnageant. Le culot est ensuite repris dans 350 µL de solution de « boiling ». Puis 25 µL de solution de lysozyme à 10 mg/mL sont ajoutés (préparé extemporanément). L'ensemble est placé dans de l'eau bouillante pendant 90 s. Le tube est ensuite centrifugé 20 min à 13,000 × g.

Le culot est alors éliminé. Puis 44 µL d'acétate de sodium 2 M et 440 µL d'isopropanol sont ajoutés au surnageant. Le tout est centrifugé 20 min à 13,000 × g.

Le culot est lavé par 500 µL d'éthanol 70%. Après séchage à l'air, le culot est suspendu dans du tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> (Tris-HCl, 10 mM ; EDTA, 1 mM ; pH 8). L'ADN extrait peut être analysé en gel d'agarose à 0,7 %.

#### 3.4.2. Utilisation de la Miniprep

La Miniprep tient son nom du kit Qiagen « QIAprep Spin Miniprep Kit » qui lui correspond. C'est une technique rapide d'extraction de plasmides à partir de quelques mL de culture. Pour obtenir une quantité de plasmides plus importante, la technique de la Maxiprep peut être utilisée à partir d'une culture de 50 mL. Elle se réalise grâce au kit d'extraction « QIAfilter<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit » (Qiagen) selon le protocole fourni.

### 3.5. ENZYMES ET KIT DE PURIFICATION

Les enzymes de restriction utilisées, l'ADN-polymérase I d'*E. coli*, et la T4 DNA-ligase proviennent de Fermentas (Fermentas, Burlington, Canada). Une autre enzyme de ligation, la ligase Takara (Takara Bio Inc, Shiga, Japon) est parfois utilisée. Les fragments d'ADN purifiés en gel d'agarose à 0,8% (Euromedex, Souffelweyersheim, France) sont extraits par « QIAquick Gel Extraction Kit » selon le protocole fourni (Qiagen). Après les réactions enzymatiques, l'ADN plasmidique a été purifié, si nécessaire, par « MinElute Reaction Cleanup Kit » selon le protocole fourni (Qiagen). Après digestion enzymatique d'un plasmide, celui-ci peut être traité à la phosphatase alcaline de crevette (Fermentas).

### 3.6. LE CLONAGE PLASMIDIQUE

Le clonage plasmidique est utilisé lors de l'insertion d'un fragment d'ADN au sein d'un vecteur. Ces fragments peuvent être issus d'une PCR ou d'une digestion enzymatique d'un autre plasmide par des enzymes de restriction. Les fragments amplifiés par PCR sont clonés dans le plasmide pGEM-T Easy (Promega), plasmide linéaire possédant une désoxythymidine débordant à chaque extrémité 5' et permettant le clonage de produits de PCR. Ce plasmide n'est répliquatif que chez *E. coli*. Il possède une cassette de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un site multiple de clonage au niveau du gène *lacZ*. Afin d'optimiser le clonage, les produits de PCR obtenus ont été préalablement adénylés en 5' par un traitement à la Taq polymérase (5 unités par  $\mu\text{L}$ ) pendant 30 min à 72°C.

Après ligation et transformation par choc thermique de la souche *E. coli* JM109 (souche et protocole fournis par Promega), la sélection des clones possédant le plasmide recombiné est réalisée sur milieu LB complété avec de l'ampicilline (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), du X-Gal (8 mg/L) et de l'IPTG (80  $\mu\text{g}/\text{L}$ ). Seuls sont sélectionnés les clones blancs. Afin de connaître l'orientation des fragments au sein du plasmide pGEM-T Easy, des extractions de plasmides par la méthode « boiling » sont réalisées et des tests par restriction sont effectués. Les plasmides qui en résultent sont extraits et purifiés avec le kit Plasmid MiniPrep (Qiagen). Les contrôles par électrophorèse sont réalisés en gel d'agarose à 0,7%. Les fragments issus de digestion enzymatique sont extraits du gel d'agarose comme indiqué § 3.5 (page 74), puis ligaturés avec un plasmide possédant des extrémités cohésives préalablement digéré aux mêmes sites de restriction que ceux du fragment, ou à des sites compatibles.

Pour ligaturer 2 fragments ensemble afin de créer un plasmide, il faut tout d'abord quantifier ceux-ci en gel d'agarose. Ensuite, il faut effectuer le calcul donnant la quantité d'insert par rapport au vecteur pour un rapport 1 à 3 (voir ci-dessous), en considérant que le vecteur sera le plus grand des fragments. Le rapport 1 à 3 a été déterminé empiriquement. Il semblerait qu'une ligature ait le plus de chance de fonctionner lorsque ce rapport entre l'insert et le vecteur est respecté. Ce rapport est calculé selon l'équation 1.

$$\frac{\text{taille de l'insert}}{\text{taille du vecteur}} \times 3 \times \text{ng de vecteur} / \mu\text{L} = \text{ng d'insert pour un rapport 1:3} \quad (1)$$

Afin d'éviter la recirculation sur lui-même du vecteur, celui-ci peut être traité à la phosphatase alcaline selon le protocole suivant : 16  $\mu\text{L}$  de plasmide; 2  $\mu\text{L}$  de phosphatase alcaline de crevette (Fermentas); 2  $\mu\text{L}$  de son tampon 10X. Le tout est incubé 30 min à 37°C. La phosphatase est ensuite désactivée par ajout de 3  $\mu\text{L}$  d'EDTA 50 mM et par incubation 30 min à 65°C. Afin d'enlever les traces de ce mélange réactionnel, l'échantillon est ensuite nettoyé grâce au kit « MinElute Reaction Cleanup Kit » (§ 3.5, page 74).

Pour effectuer une ligature avec la T4 DNA Ligase (Fermentas), voici les quantités requises des différents constituants : pour un volume final de 20  $\mu\text{L}$ , on ajoutera : 1  $\mu\text{L}$  de vecteur; x  $\mu\text{L}$  d'insert (fonction de la réponse trouvée au rapport 1/3) ; 2  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase ; 2  $\mu\text{L}$  de tampon pour T4 ; qsp en eau milli-Q. Le tout sera incubé une nuit à 16°C ou 2 h à 25°C.

Pour une ligature en utilisant la ligase Takara (Takara): 1  $\mu\text{L}$  de vecteur; x  $\mu\text{L}$  d'insert (fonction de l'équation 1); x + 1  $\mu\text{L}$  de Takara (contenant son propre tampon). De même l'incubation est d'une nuit à 16°C ou de 2 h à 25°C.

### 3.7. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

L'électrophorèse en gel d'agarose est réalisée pour la vérification et la quantification de l'ADN extrait, qu'il soit sous forme plasmidique ou non. L'analyse qualitative permet, grâce à un marqueur de taille, de pouvoir sélectionner un fragment d'ADN de taille voulue, afin par exemple de vérifier l'orientation d'un fragment à l'intérieur d'un plasmide ou tout simplement pour récupérer un fragment déterminé et l'extraire par la suite (§ 3.5, page 74).

L'analyse quantitative en gel d'agarose permet, quant à elle, de pouvoir déterminer par approximation la concentration de matériel génétique dans notre échantillon en le comparant aux intensités du marqueur de taille qui est étalonné en concentration. Elle s'effectue dans un gel d'agarose à 0,7 % pour les fragments d'une taille supérieure à 1 kb et de 1 à 1,5% pour les fragments inférieurs à 1 kb. La migration s'effectue à 110 V pendant une heure dans du tampon Tris Borate EDTA 0.5X pH 8,3, préparé à partir d'une solution concentrée 5X dont la composition pour un litre est la suivante : Tris 445 mM; acide borique 445 mM; EDTA 12,5 mM.

Le gel d'agarose est préparé en dissolvant l'agarose dans le volume correspondant de tampon TBE (0.5X). Le tout est ensuite chauffé quelques minutes au four micro-ondes pour dissoudre l'agarose. Après un léger refroidissement, un volume correspondant à 1/5000 de bromure d'éthidium est ajouté avec précaution. Le gel est enfin coulé dans le support prévu à cet effet en n'oubliant pas d'insérer auparavant le peigne destiné à la création des puits. Une fois solidifié, le gel est déposé dans la cuve d'électrophorèse et 10 µL d'échantillon, mélangés à 2 µL de tampon de charge (Saccharose, 50% ; EDTA, 50 mM ; Bleu de bromophenol 0,01 %; Urée, 4 M), sont déposés dans chaque puits.

Un marqueur de poids moléculaire est aussi déposé dans un des puits comme référence afin d'estimer la taille du ou des fragments contenus dans les échantillons et éventuellement leur concentration. Les marqueurs de poids moléculaire utilisés dans ces travaux sont : O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas), Smart Ladder, Smart Ladder SF (Eurogentec),  $\lambda$  HindIII (stock du laboratoire). Le détail de ces marqueurs est présenté en annexe I. Les résultats sont lus à l'aide de l'appareil GelDoc de Bio-Rad. L'analyse se fait à l'aide du logiciel Quantity One (version 4.1.1) et les photos sont exportées au format TIFF.

### 3.8. LES TECHNIQUES DE TRANSFORMATION

#### 3.8.1. Préparation des plasmides

Le plasmide utilisé dans une transformation peut être préparé de différentes manières afin de multiplier les chances de réussite de cette dernière. Il peut être utilisé sous sa forme circulaire native ou sous forme linéaire après digestion enzymatique au niveau d'un site de restriction unique. Enfin, il peut être sous une forme amplifiée après traitement avec le kit « Templphi DNA amplification » (GE-Healthcare Europe GmbH, Munich, Allemagne) selon le protocole fourni.

### 3.8.2. Préparation des cellules

Afin de rendre les cellules transformables, les cellules d'*E. coli* JM109 sont préparées par la méthode au chlorure de rubidium (RbCl). Ce traitement va permettre de rendre les cellules compétentes et de les conserver relativement longtemps à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Le protocole de préparation nécessite l'utilisation de deux solutions tampon dont la composition pour un litre est la suivante:

Tampon 1: Acétate de potassium, 2,91 g/L ; RbCl, 12 g/L ;  $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$ , 1,46 g/L,  $\text{MnCl}_2 (4\text{H}_2\text{O})$ , 9,88 g/L; Glycérol 15 %, 150 mL. Le pH est ajusté à 5,8 avec de l'acide acétique 200 mM.

Tampon 2: PIPES, 3 g/L; RbCl, 1,25 g/L;  $\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O})$ , 11 g/L, Glycérol 15 %, 150 mL.

Les tampons 1 et 2 sont stérilisés par autoclavage à  $121^{\circ}\text{C}$  pendant 20 min et conservés à  $4^{\circ}\text{C}$ .

La souche est tout d'abord isolée sur milieu gélosé LB +  $\text{MgSO}_4$  10 mM et incubée une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$ . Une colonie est alors reprise pour ensemercer une première culture, appelée P1, dans 5 mL de milieu SOB préchauffés ( $37^{\circ}\text{C}$ ) et incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  sous forte agitation jusqu'à une  $\text{DO}_{600} = 0,3$ . Ensuite 2,5 mL de P1 sont prélevés pour ensemercer P2, contenant 50 mL de SOB préchauffés et incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  sous forte agitation jusqu'à une  $\text{DO}_{600} = 0,4$  (cela peut prendre 2 à 4 h selon la souche). La culture est alors refroidie dans la glace et centrifugée 5 min à  $5\,000 \times g$  (refroidir préalablement le rotor à  $4^{\circ}\text{C}$ ). Le culot est repris par 16 mL de tampon 1 froid et laissé 5 min dans la glace. Une nouvelle centrifugation de 5 min à  $5\,000 \times g$  et à  $4^{\circ}\text{C}$  est nécessaire. Puis le culot est remis en suspension dans 4 mL de tampon 2 froid et laissé 15 min dans la glace. Enfin la préparation est répartie en fractions aliquotes de 200  $\mu\text{L}$  dans des tubes Eppendorf froids et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8.3. Transformation par choc thermique

Ce type de transformation est le plus souvent utilisé pour intégrer un plasmide répliatif dans *E. coli*. Les manipulations s'effectuent dans la glace. Tout d'abord il faut faire décongeler dans la glace le tube des cellules d'*E. coli* JM109 pendant 10 min (provenant de Promega ou de parties aliquotes préalablement préparées par la méthode au RbCl) et centrifuger un très court moment (« short spin ») les tubes issus de la ligation (afin de ramener la totalité au fond du tube).

Puis quelques  $\mu\text{L}$  de la ligation sont placés dans les tubes Eppendorf avec 50  $\mu\text{L}$  d'*E. coli*. Le tout est mélangé doucement et laissé 20 min dans la glace. Le choc thermique est alors réalisé en mettant les tubes 90 secondes à 42°C sans agiter puis 2 min dans la glace. Enfin, 950  $\mu\text{L}$  de milieu SOC sont ajoutés et incubés 1 h 30 min à 37°C sans agitation. Après incubation, la suspension est étalée sur milieu LB gélosé + ATB à raison de 200  $\mu\text{L}$ /boîte. Le tout est incubé 1 nuit à 37°C.

#### 3.8.4. Transformation par compétence naturelle

Cette technique est utilisée pour la transformation de *B. subtilis* et plus particulièrement avec la souche 168 qui est une souche naturellement compétente. Premièrement, 5 mL de milieu MS1 sontensemencés à  $\text{DO}_{600} = 0,7$  à partir d'un isolement frais de la souche. La culture est incubée pendant 5 h à 37°C. Deuxièmement, la culture est diluée au 10<sup>ème</sup> de volume dans du milieu MS2 et incubée pendant 90 min à 37°C.

Enfin, environ 100 ng d'ADN plasmidique sont ajoutés à 100  $\mu\text{L}$  de cellules compétentes. Le mélange est incubé 30 min au bain-marie à 37°C. Les cellules sont ensuite étalées sur un milieu LB gélosé contenant les antibiotiques nécessaires à la sélection des clones recombinants.

#### 3.8.5. Transformation par électroporation

Cette technique est utilisée en présence d'une souche récalcitrante aux autres techniques de transformation. Premièrement, une fiole contenant 10 mL de LB est inoculée à partir d'un isolat frais et incubée une nuit sous agitation à 37°C. Puis, 1 mL de cette culture est utilisé pour inoculer 50 mL d'une nouvelle culture de LB qui sont incubés environ 5 h à 37°C avec agitation jusqu'à la phase logarithmique tardive ( $\text{DO}_{600} = 1$ ). Un prélèvement de 20 mL de cette culture est réalisé dans un tube à centrifuger stérile (Falcon) et refroidi dans la glace. Le tout est centrifugé à 2300  $\times$  g pendant 10 min à 4°C. Puis le surnageant est retiré et le culot cellulaire est doucement remis en suspension dans 20 mL de MEB glacé. Le tout est à nouveau centrifugé à 2300  $\times$  g pendant 10 min à 4°C. Cette étape est effectuée une seconde fois comme décrit ci-dessus. De même, le surnageant est retiré et le culot cellulaire est remis en suspension dans 1 mL de MEB glacé, transféré dans un tube stérile de 1,5 mL pré-refroidi, puis centrifugé à 2300  $\times$  g pendant 5 min à 4°C.

Après retrait du surnageant, le culot cellulaire est doucement remis en suspension dans 100  $\mu$ L de MEB et 150 ng d'ADN plasmidique sont mélangés avec 100  $\mu$ L de cellules, et le tout est incubé dans de la glace pendant 5 min avant électroporation. Le mélange est alors placé dans une cuvette d'électroporation pré-refroidie d'épaisseur utile 0,2 cm, et soumis à électroporation. Les paramètres de l'appareil Gene Pulser Bio-Rad sont 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ , 2,5 kV (12,5 kV/cm). Immédiatement après la décharge du condensateur à travers les cellules, 900  $\mu$ L de SOC sont ajoutés à température ambiante directement dans la cuvette, et mélangés doucement. Les cellules sont enfin transférées dans le tube d'origine, incubées 1 h à 37°C et étalées sur du milieu LB préchauffé contenant le(s) antibiotique(s) approprié(s). Le tout est incubé 24 h à 37°C.

La composition d'un litre de tampon MEB est la suivante : HEPES, 240 mg/L;  $MgCl_2$  ( $6H_2O$ ), 203 mg/L. Le pH est ajusté à 7,0. Stérilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min et conservation à 4°C.

### 3.9. LA VERIFICATION DES CONSTRUCTIONS GENETIQUES

Différentes stratégies existent pour vérifier des constructions génétiques. Lors de la construction d'un plasmide, sa présence est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,7%, après extraction de ce dernier comme décrit précédemment (§. 3.4, page 73). De même, afin de connaître l'orientation des fragments au sein du plasmide, des digestions par des enzymes de restriction sont effectués.

Lors de la construction d'une souche par recombinaison homologue ou recombinaison de type Campbell, l'insertion du fragment désiré dans le génome est vérifiée par amplification PCR en utilisant les couples d'amorces situés en dehors de la séquence plasmidique et listés dans le Tableau 6, page 69. Enfin, pour s'assurer qu'une séquence amplifiée par PCR et insérée au sein d'un plasmide ou d'un génome ne contient pas de mutations, un séquençage du plasmide ou d'un fragment d'ADNg a été réalisé par Congenics Genome Express (Meylan, France). Afin de s'assurer de la stabilité de la construction, 10 repiquages successifs au cure-dents sont réalisés sur LB gélosé avec 100 colonies d'un même transformant, puis un dernier repiquage, sur LB contenant l'antibiotique de sélection. La stabilité de la construction est alors mesurée en comptant le nombre de colonies ayant conservé la résistance à l'antibiotique. Pour l'ensemble de nos souches une stabilité des inserts allant de 94 à 100% est observée.

#### 4. STRATÉGIES D'OPTIMISATION MOLECULAIRE DE LA SYNTHÈSE DE SURFACTINE CHEZ *B. SUBTILIS*.

Dans cette étude, des modifications génétiques de *B. subtilis* 168, dont le génome est entièrement séquencé (Kunst *et al.*, 1997), ont été effectuées dans le but d'obtenir une souche mono-productrice constitutive de surfactine. La stratégie mise en œuvre a été la suivante :

- La synthèse de lipopeptides a été rétablie chez *B. subtilis* 168 par insertion du gène *sfp* provenant de la souche ATCC 21332.
- Les forces du promoteur natif  $P_{srfA}$  et du promoteur constitutif  $P_{repU}$ , provenant de *Staphylococcus aureus* ont tout d'abord été comparées chez *B. subtilis* grâce à une fusion de ceux-ci avec le gène *lacZ*.
- Le remplacement du promoteur natif de l'opéron *srfA* par  $P_{repU}$  a ensuite été entrepris à deux endroits différents en amont de la première ORF de l'opéron *srfA* chez *B. subtilis* 168 et dans son dérivé  $Sfp^+$ , BBG111.
- Ensuite, la synthèse de plipastatine a été interrompue dans les différentes souches mutantes par interruption du gène *ppsA*.
- Enfin chez certains dérivés, une interruption du gène *spoIIIA* a également été réalisée.

Pour toutes les manipulations qui suivent, l'ADN génomique total des souches *B. subtilis* 168 et ATCC 21332 est extrait comme décrit précédemment (§ 3.1, page 68). Le criblage des plasmides répliqués chez les différents transformants d'*E. coli* est réalisé selon la méthode du « boiling » (§ 3.4.1, page 73). Les transformations d'*E. coli* sont réalisées par choc thermique (§ 3.8.3, page 77). *B. subtilis* 168 est transformée soit par la méthode de la compétence naturelle, soit par électroporation (§ 3.8, page 76). Les amplifications PCR sont réalisées avec les amorces listées dans le Tableau 5, page 68, comme décrit précédemment (§ 3.2, page 68).

Toutes les cassettes générées par PCR sont purifiées et quantifiées à partir d'un gel d'agarose à 1% comme décrit précédemment (§ 3.5, page 74). Tous les plasmides utilisés pour réaliser les différentes transformations de *B. subtilis* 168, qu'ils soient extraits d'*E. coli* ou digérés par des enzymes de restriction sont tout d'abord purifiés et quantifiés en gel d'agarose et préparés comme décrit précédemment (§ 3.4, page 73; § 3.8.1, page 76). Les transformants sont sélectionnés sur LB gélosé contenant les antibiotiques requis et incubés à 37°C pendant 48 h. Les modifications génétiques sont démontrées par PCR (§ 3.9, page 79).

#### 4.1. RETABLISSEMENT DE LA SYNTHÈSE DE LIPOPEPTIDES CHEZ *B. SUBTILIS* 168 (BBG111)

Après extraction de l'ADN génomique de la souche *B. subtilis* ATCC 21332 (§ 3.1, page 68), le gène *sfp* est amplifié par PCR en utilisant les amorces *sfp* sens et antisens. Le fragment est alors extrait du gel d'agarose (§ 3.5, page 74) et cloné dans le plasmide pGEM-T Easy. Après ligation, le plasmide est introduit dans la souche *E. coli* JM109. Le plasmide pGEM-T Easy contenant le fragment *sfp* (4139 pb), porté par la souche d'*E. coli* EBG121, a été dénommé pBG115. Afin de connaître l'orientation du gène *sfp* dans le pGEM-T Easy, une analyse par restriction à l'aide de l'enzyme *TatI* est effectuée.

La cassette *sfp* est ensuite extraite du plasmide pBG115, puis clonée dans un plasmide dérivé de pDG1661, appelé pBG128 (7236 pb). Ce dernier porté par la souche *E. coli* EBG125, a été préalablement délété du fragment *spoVG-lacZ* après l'action de l'enzyme *PvuII* et religaturé sur lui-même. Les plasmides pBG115 et pBG128 sont digérés par *EcoRI* et le fragment *sfp* provenant de pBG115 est cloné dans pBG128 (§ 3.6, page 74).

Le plasmide pBG129 (8378 pb), porté par la souche *E. coli* EBG134, résultant de l'intégration du fragment *sfp* dans pBG128 est vérifié par digestion enzymatique avec *EcoRI* et *HindIII* afin de vérifier l'orientation du fragment *sfp*. Linéarisé par *XhoI*, il a ensuite servi à transformer *B. subtilis* 168 et a permis l'intégration de *sfp* au locus *amyE* par recombinaison homologue. Les transformants sont sélectionnés sur LB + Cm (5 µg/mL) et vérifiés par amplification PCR du locus *amyE* et par repiquages successifs (§ 3.9, page 79). Le transformant obtenu a été dénommé BBG111.

4.2. COMPARAISON DE LA FORCE DES PROMOTEURS  $P_{SRFA}$  ET  $P_{REPU}$  CHEZ *B. SUBTILIS* 168

Afin de comparer la force des promoteurs  $P_{srfA}$  et  $P_{repU}$  chez *B. subtilis* 168, ceux-ci ont été fusionnés avec le gène *lacZ*, codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Ainsi l'activité de cette dernière permettra de comparer la force des deux promoteurs.

## 4.2.1. Construction de la souche BBG127

Pour la construction du plasmide dérivé de pDG1661, qui servira à l'insertion du promoteur  $P_{srfA}$ , fusionné avec le gène *lacZ*, au sein du génome de *B. subtilis* 168 par recombinaison homologue avec le locus *amyE*, les étapes suivantes ont été réalisées.

Tout d'abord le plasmide pDG1661 (10156 pb) est extrait d'*E. coli* EBG108 par Maxiprep afin d'obtenir une grande quantité qui servira par la suite. Le plasmide extrait est conservé dans du tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> à -20°C. Il est ensuite digéré par *EcoRI*. Dans le même temps, une cassette  $\epsilon P_{srfA}$  est générée par PCR en utilisant les amorces  $P_{srfA}$  sens et antisens (§ 3.2, page 68) et clonée au sein du vecteur pGEM-T Easy (§ 3.6, page 74). Ce plasmide est ensuite extrait par Miniprep (§ 3.4.2, page 73). La cassette  $\epsilon P_{srfA}$  est extraite du vecteur par digestion *EcoRI* (§ 3.4.2, page 73), puis ligaturée avec les extrémités *EcoRI* du plasmide pDG1661 préalablement digéré, quantifié et traité à la phosphatase alcaline (§ 3.5, page 74). Cette construction, appelé pBG148B, portée par la souche *E. coli* EBG145B, est extraite par Miniprep et l'orientation du fragment  $P_{srfA}$  est déterminée par digestion enzymatique en trois points par *SaII*. Enfin pBG148B est linéarisé par *XhoI* et purifié puis utilisé pour transformer *B. subtilis* 168. Les transformants sont sélectionnés sur LB + Cm (5  $\mu$ g/mL) et vérifiés par amplification par PCR du locus *amyE* grâce aux amorces *amyE* sens et antisens et par repiquages successifs (§ 3.9, page 79). Le transformant ainsi obtenu est dénommé BBG127.

## 4.2.2. Construction de la souche BBG128

Pour la construction du plasmide dérivé de pDG1661 (10156 pb) désigné pour l'insertion du promoteur  $P_{repU}$  fusionné avec le gène *lacZ* au sein du génome de *B. subtilis* 168 par recombinaison homologue avec le locus *amyE*, les étapes suivantes sont réalisées.

Tout d'abord le plasmide pDG1661, préparé précédemment est digéré par *EcoRI*. Dans le même temps le plasmide pBG106 (5276 pb) est extrait par Maxiprep de la souche d'*E. coli* EBG106 (Leclère *et al.*, 2005), afin d'obtenir une grande quantité qui servira aussi par la suite. Le plasmide extrait est stocké dans du tampon T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> à -20°C. La cassette  $\epsilon P_{repu-neo}$  est extraite du vecteur par digestion *EcoRI*, puis ligaturée avec les extrémités *EcoRI* du plasmide pDG1661 préalablement digéré. Cette construction, appelée pBG148, portée par la souche EBG145, est extraite par Miniprep et l'orientation du fragment  $P_{repu-neo}$  est vérifiée par digestion enzymatique en trois points par *SalI*. Enfin pBG148 est linéarisé par *XhoI* et est utilisé pour transformer *B. subtilis* 168. Les transformants sont sélectionnés sur LB + Nm (30  $\mu\text{g/mL}$ ) et vérifiés par amplification par PCR du locus *amyE* et par repiquages successifs (§ 3.9, page 79). Le transformant ainsi obtenu est dénommé BBG128.

#### 4.3. REMPLACEMENT DU PROMOTEUR $P_{SRFA}$ PAR LE PROMOTEUR CONSTITUTIF $P_{REPU}$ CHEZ *B. SUBTILIS* 168 ET BBG111

Dans le but de s'affranchir des mécanismes de régulation qui gouvernent l'opéron *srfA*, un changement de promoteur a été effectué. De plus, considérant importante l'information révélée par Nakano *et al.* (1991), le remplacement du promoteur  $P_{srfA}$  par le promoteur  $P_{repu}$  a été effectué à deux endroits différents chez *B. subtilis* 168. Les différentes étapes ont été réalisées comme suit :

Premièrement, afin de générer les souches BBG113 et BBG118, le remplacement a été effectué entre la fin du gène *hxlR* et le site de restriction *HaeIII*, situé 140 pb en amont du RBS de l'opéron *srfA*. La séquence importante étant ainsi conservée.

Deuxièmement, afin de générer les souches BBG113B et BBG118B, le remplacement a été effectué entre la fin du gène *hxlR* et le RBS de l'opéron *srfA*, ne conservant pas de ce fait la séquence de 140 bp précédemment décrite.

##### 4.3.1. Construction des souches BBG118 et BBG113

Pour la construction du plasmide dérivé de pBG106 (5276 pb) servant à la construction des souches BBG113 et BBG118, les fragments  $\epsilon hxlR$  et  $\epsilon HaeIII-srfAA$  sont générés par PCR en utilisant les couples d'amorces *hxrIR* sens et antisens et *srfAAI* sens et antisens (Tableau 6, page 69). Ces cassettes sont purifiées et quantifiées en gel d'agarose (§ 3.7, page 75, Fig. 17, page 84), puis clonées dans pGEM-T Easy.

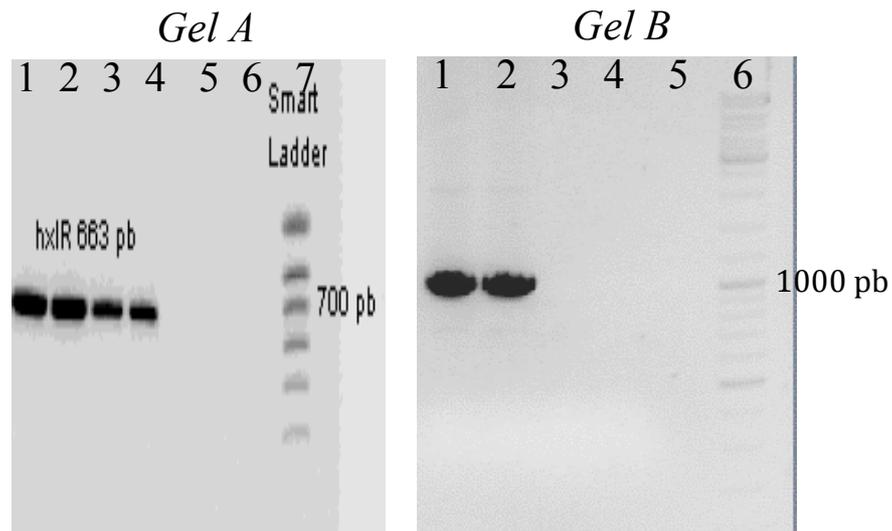


Fig. 17 Fragments amplifiés par PCR des gènes *hxlR* (Gel A ; pistes 1 à 4 : fragment PCR ; piste 7 : PM, Smart Ladder SF) et *srfAA* (Gel B ; pistes 1 et 2 : fragment PCR ; piste 6 : PM, O'GeneRuler).

Après ligation, les plasmides sont introduits dans *E. coli* DH5 $\alpha$ . Le plasmide pGEM-T Easy contenant le fragment *hxlR* (3678 pb), porté par la souche *E. coli* EBG126, a été dénommé pBG120. Le plasmide pGEM-T Easy contenant le fragment *HaeIII-srfAA* (4154 pb), porté par la souche *E. coli* EBG127, fut dénommé pBG123. L'insertion du fragment *hxlR*, dans pBG106, étant directionnelle il est nécessaire de connaître l'orientation du fragment *hxlR* dans le plasmide pBG120, celui-ci est extrait par Miniprep et des tests par restriction à l'aide de l'enzyme *PvuII* sont donc effectués. La bonne orientation de la cassette est déterminée si, comme indiqué ci-dessous (Fig. 18, page 84), après digestion par *PvuII*, trois fragments de taille respective, 2564 pb, 619 pb et 495 pb sont obtenus.

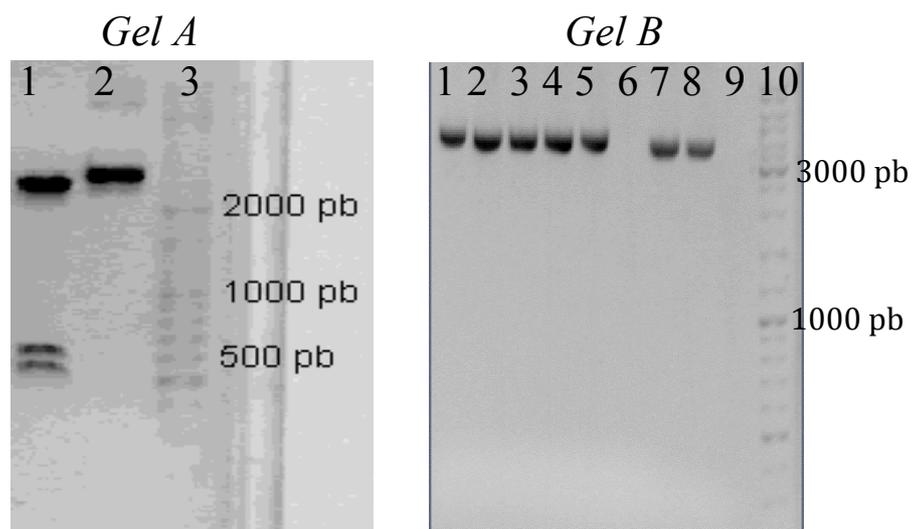


Fig. 18 Vérification des plasmides pBG120 (Gel A : digestion enzymatique de pBG120 par *PvuII*. Piste 1 : pBG120 digéré par *PvuII*; Piste 2 : pBG120 non digéré; Piste 3 : PM, O'Gene Ruler), pBG123 et pBG123B (Gel B. Pistes 1 à 5 : pBG123 ; Pistes 7 et 8 : pBG123B ; Piste 10 : PM, O'GeneRuler).

Le fragment *hxlR* est ensuite extrait du plasmide pBG120, par digestion au site *SalI* et *SphI*, puis cloné dans le plasmide pBG106. Ce dernier porté par la souche *E. coli* EBG106, a été préalablement digéré par *SalI* et *SphI* et purifié en gel d'agarose comme indiqué ci-dessous (§ 3.7, page 75 ; Fig. 19, page 85). Le transformant ayant intégré ce nouveau plasmide appelé pBG127 (5271 pb) est sélectionné sur LB + Nm (30 µg/mL) et dénommé EBG128.

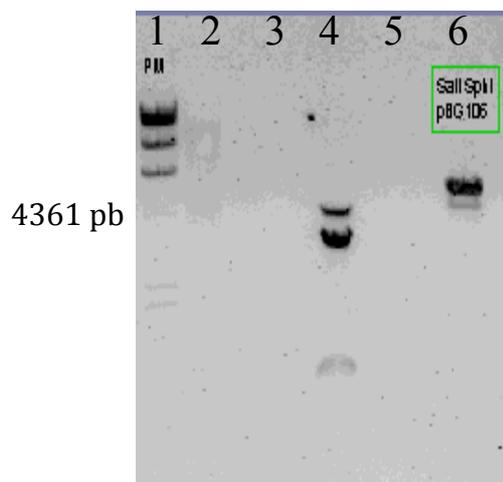


Fig. 19 Digestions enzymatiques de pBG106 et pBG120 par *SalI* et *SphI*, les trois fragments attendus sont retrouvés sur ce gel : Piste 1 : PM,  $\lambda$  *HindIII*; Piste 4 : pBG120 digéré par *SalI* et *SphI*; Piste 6 : pBG106 digéré par *SalI* et *SphI*.

Parallèlement, le fragment *HaeIII-srfAA* est extrait du plasmide pBG123, par digestion au site *EcoRI*, puis cloné dans le plasmide pBG106. Ce dernier a été préalablement digéré par *EcoRI*.

Les transformants d'*E. coli* JM109 ayant intégré ce nouveau plasmide appelé pBG124 (5864 pb; Fig. 20, page 86; gel A) sont sélectionnés sur LB + Nm (30 µg/mL) et dénommés EBG132. Le clonage n'étant pas directionnel, une vérification de l'orientation du fragment *HaeIII-srfA* dans pBG106 est réalisée par digestion *PvuII* de pBG124. Enfin les plasmides pBG124 et pBG127 sont digérés par *PacI* et *BglII*, le long fragment de pBG124 contenant le fragment *HaeIII-srfAA* est purifié en gel d'agarose et quantifié (Fig. 20, page 86; gel B). Puis celui-ci est ligaturé avec le petit fragment issu de la digestion du plasmide pBG127, contenant les fragments *hxlR* et *P<sub>repU-neo</sub>*.

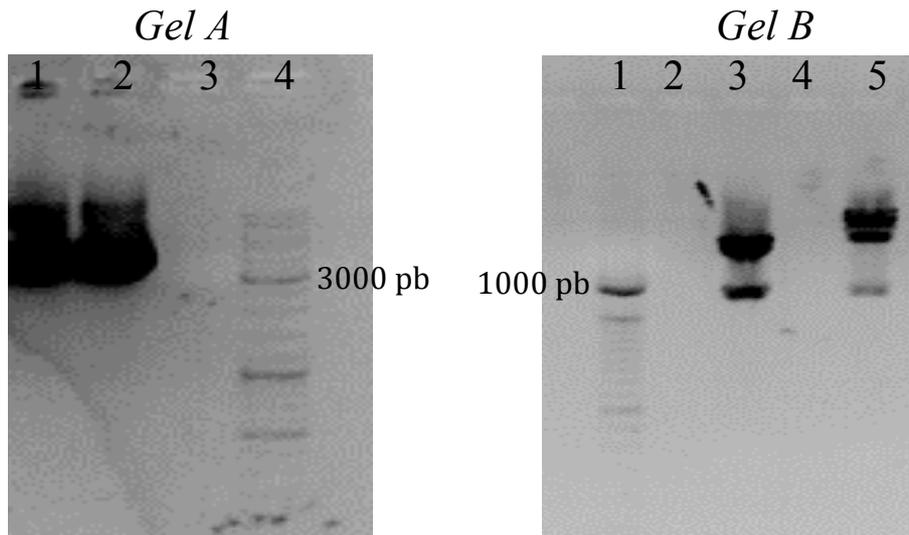


Fig. 20 Gel A, Vérification de pBG124. Piste 1 et 2 : pBG124 ; piste 4 : PM, O'GeneRuler. Gel B, Digestions de pBG124. Piste 1 : PM, Smart Ladder SF; piste 3 : pBG127 digéré par *Bgl*III et *Pac*I ; piste 5 : pBG124 digéré par *Bgl*III et *Pac*I.

Le transformant d'*E. coli* JM109 ayant intégré ce nouveau plasmide, appelé pBG133 (5870 pb), est sélectionné sur LB + Nm (30 µg/mL) et dénommé EBG133.

Ce plasmide est alors extrait par Miniprep et linéarisé par *Pst*I (Fig. 21, page 86) ou amplifié par Templphi afin de transformer par compétence naturelle et/ou électroporation *B. subtilis* 168 et BBG111 (§ 3.8, page 76). L'organigramme des manipulations génétiques conduisant à la construction de ces nombreux plasmides est présenté en annexe II.

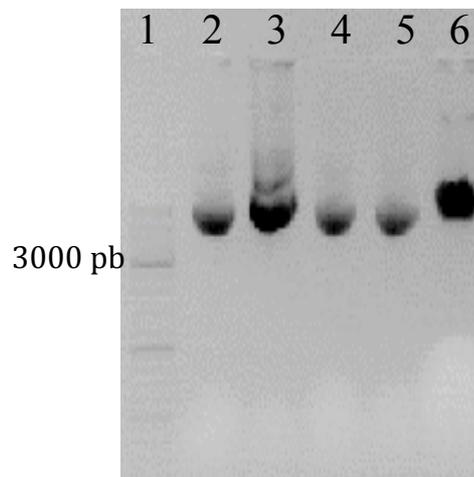


Fig. 21 Vérification de pBG133. Piste 1 : PM, O'Gene Ruler ; pistes 2 à 5 : pBG133 non digéré ; piste 6 : pBG133 digéré par *Pst*I.

Après recombinaison homologue, les transformants ayant intégré le nouveau promoteur  $P_{repU}$  en amont de l'opéron *srfA* sont sélectionnés sur LB + Nm (30 µg/mL) et sont dénommés respectivement BBG118 et BBG113.

La construction BBG113 a été vérifiée par amplification PCR grâce aux amorces *hxlR2* sens et *srfAA2* antisens, par repiquages successifs (§ 3.9, page 79) et par séquençage de la séquence  $P_{repU-neo-srfAA}$  obtenu par PCR en utilisant les primers  $P_{repU-neo}$  sens et *srfAA3* antisens (Tableau 6, page 69).

#### 4.3.2. Construction des souches BBG118B et BBG113B

Pour la construction du plasmide dérivé de pBG106 servant à la construction des souches BBG113B et BBG118B, le fragment *srfAA* est généré par PCR en utilisant les couples d'amorces *srfAA2* sens *srfAA1* antisens. Cette cassette est purifiée et quantifiée en gel d'agarose (Fig. 22, page 87), puis clonée dans pGEM-T Easy.

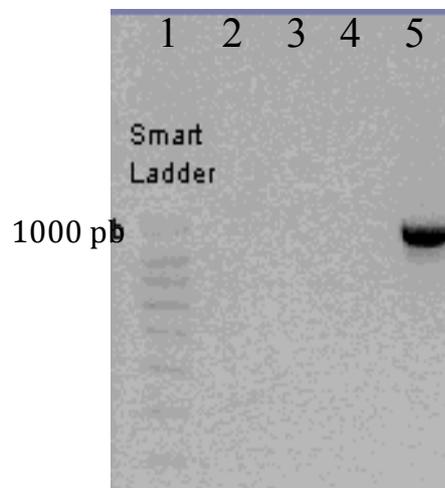


Fig. 22 Fragment amplifié par PCR du gène *srfAA*. Piste 1 : PM, Smart Ladder SF ; Piste 5 : fragment PCR du gène *srfAA*.

Après ligation, le plasmide est introduit dans les souches *E. coli* JM109. Le plasmide pGEM-T Easy contenant le fragment *srfAA* (989 pb), porté par la souche *E. coli* EBG127B, a été dénommé pBG123B (4010 pb), ce dernier est extrait par Miniprep et purifié en gel pour vérification (Fig. 18, page 84).

Ensuite, le fragment *srfAA* est extrait du plasmide pBG123B, par digestion au site *EcoRI*, purifié et quantifié en gel d'agarose, puis cloné dans le plasmide pDG106. Ce dernier a été préalablement digéré par *EcoRI* et traité par la phosphatase alcaline (§ 3.5, page 74). Le transformant ayant intégré ce nouveau plasmide appelé pBG124B (5731 pb; Fig. 23, page 88) est sélectionné sur LB + Nm (30  $\mu\text{g/mL}$ ) et dénommé EBG132B. Le clonage n'étant pas directionnel, une vérification de l'orientation du fragment *srfAA* au sein de pBG124B est réalisée par une digestion par *PvuII*.

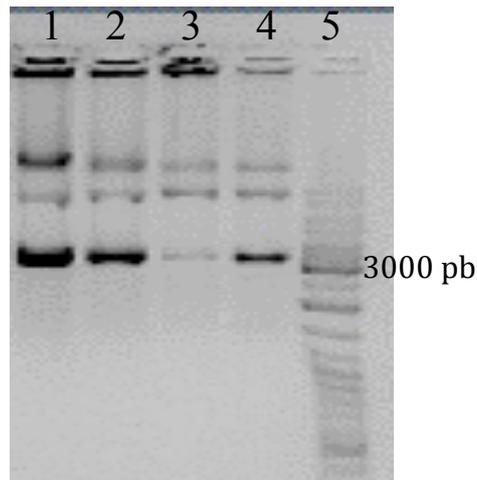


Fig. 23 Vérification du plasmide pBG124B. Sur ce gel les trois formes plasmidiques sont observées : circulaire ouverte, linéaire et superenroulée. Pistes 1 à 4 : pBG124B ; Piste 5 : PM, O'GeneRuler.

Enfin les plasmides pBG124B et pBG127 sont digérés par *Sph*I et *Bgl*II, le long fragment de pBG124B contenant le fragment *srfAA* est purifié en gel d'agarose et quantifié (Fig. 24, page 88). Puis celui-ci est ligaturé avec le petit fragment issu de la digestion du plasmide pBG127, contenant les fragments *hxlR* et *P<sub>repU</sub>-neo*. Les transformants ayant intégré ce nouveau plasmide, appelé pBG133B (5726 pb), sont sélectionnés sur LB + Nm (30 µg/mL) et dénommés EBG133B.

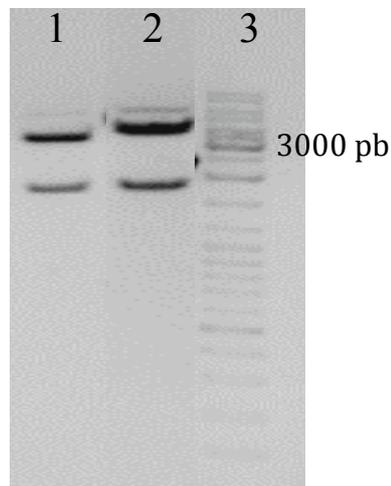


Fig. 24 Digestion par *Sph*I et *Bgl*II de pBG127 et pBG124B. Piste 1 : pBG127; Piste 2 : pBG124B; Piste 3 : PM, O'GeneRuler.

Ce plasmide est alors linéarisé par *Sca*I ou amplifié par Templphi pour transformer par compétence naturelle et/ou électroporation *B. subtilis* 168 et BBG111 (§ 3.8, page 76). Après recombinaison homologue, les transformants ayant intégré le nouveau promoteur *P<sub>repU</sub>* en amont de l'opéron *srfA* sont sélectionnés sur LB + Nm (30 µg/mL) et sont dénommés respectivement BBG118B et BBG113B.

La construction BBG113B est vérifiée par amplification PCR grâce aux amorces *hxlR2* sens et *srfAA2* antisens, par repiquages successifs (§ 3.9, page 79) et par séquençage de la séquence  $P_{repU-neo-srfAA}$  obtenue par PCR en utilisant les amorces  $P_{repU-neo}$  sens et *srfAA3* antisens (Tableau 6, page 69).

#### 4.4. INTERRUPTION DE LA SYNTHÈSE DE PLIPASTATINE CHEZ LES DERIVES DE *B. SUBTILIS* 168 (BBG130, BBG131, BBG131B)

Cette modification arrive au terme des différentes stratégies mises en œuvre pour mettre en place une stratégie efficace, il convient de procéder étape par étape afin de pouvoir choisir au mieux la voie qui permettra de remplir l'objectif fixé.

Le but étant d'empêcher la production de plipastatine, un des gènes codant pour les synthétases de la plipastatine sera interrompu par insertion d'une séquence à l'intérieur de l'opéron *pps*.

D'après la littérature, l'ordre des gènes selon la transcription de l'opéron *pps* est la suivante : Promoteur  $\rightarrow ppsA \rightarrow ppsB \rightarrow ppsC \rightarrow ppsD \rightarrow ppsE$ . Il semblerait plus avantageux de travailler avec *ppsA* (car il s'agit du 1<sup>er</sup> gène), c'est-à-dire le premier gène placé en aval du promoteur (Lin *et al.*, 1999). Si un autre gène était interrompu, le début de la synthèse pourrait s'amorcer et le risque d'obtenir une protéine tronquée serait plus grand.

Une fois ce gène choisi, il faut pouvoir modifier la séquence afin de mettre fin à la traduction de celui-ci. La méthode la plus simple pour interrompre un gène est en général de trouver un marqueur antibiotique qui permet de discriminer les souches dont le gène serait interrompu (le marqueur serait inséré dans *ppsA*). Sachant que les souches qui sont dérivées de *B. subtilis* 168 ont déjà subi plusieurs modifications et sont déjà résistantes à de nombreux antibiotiques ( $Cm^R$ ,  $Nm^R$ ), deux possibilités restent envisageables : soit insérer une cassette de résistance à la spectinomycine, soit un autre système de sélection spécifique. La souche 168 est auxotrophe pour le tryptophane suite à une mutation du gène *trpC*. Ce gène code pour une indole-3-glycérol-phosphatase synthétase qui catalyse une réaction indispensable dans la biosynthèse du tryptophane.

Une insertion du gène *trpC* de *B. subtilis* ATCC 21332 (qui est Trp<sup>+</sup>) à l'intérieur du gène *ppsA* permettra, en plus de l'interruption de *ppsA*, de rendre la souche 168 prototrophe. Seules les souches recombinantes devenues prototrophes pourront dès lors se développer sur un milieu en absence de tryptophane. Cette stratégie a d'ailleurs déjà été utilisée par voie plasmidique (Keggins *et al.*, 1979).

La stratégie consistant à interrompre le gène *ppsA* par le gène *trpC* a été mise en œuvre, mais sans succès. Les amplifications par PCR d'un fragment du gène *ppsA*, grâce à l'utilisation des amorces *ppsA1* sens et antisens, et du gène *trpC* provenant de *B. subtilis* ATCC 21332, grâce à l'utilisation des amorces *trpC* sens et *trpC* antisens, ont été réalisées. Les fragments ont ensuite été purifiés, quantifiés en gel d'agarose et clonés dans pGEM-T Easy. Le plasmide pGEM-T Easy contenant le fragment *ppsA*, porté par la souche *E. coli* EBG143, a été dénommé pBG146 (9501 pb). L'orientation du fragment *ppsA* a été vérifiée. Malheureusement après de nombreuses tentatives infructueuses, le clonage du fragment *trpC* dans pGEM-T Easy, n'a jamais abouti.

Dès lors, la stratégie visant à insérer une cassette de résistance pour interrompre le gène *ppsA* a été réalisée selon les étapes suivantes. La cassette de résistance à la spectinomycine portée par le plasmide pDG1661 est extraite par digestion *NarI* + *XhoI*, purifiée et quantifiée en gel d'agarose puis clonée dans le plasmide pBG146, préalablement digéré par *NarI* + *XhoI*, purifié et quantifié en gel d'agarose. Le plasmide résultant, appelé pBG149 (10241 pb, Fig. 25, page 91), porté par la souche *E. coli* EBG146, est extrait par Miniprep, purifié et quantifié en gel d'agarose. Afin de réaliser la transformation par compétence naturelle des dérivés de *B. subtilis* 168, ce dernier est linéarisé par *ScaI* ou amplifié par Templphi. Il a ensuite permis l'interruption du gène *ppsA* par recombinaison homologue avec le génome des souches dérivées de *B. subtilis* BBG111, BBG113 et BBG113B. Les transformants sont sélectionnés sur LB + Spc (100 µg/mL) et vérifiés par amplification PCR du locus *ppsA* grâce à l'utilisation des amorces *ppsA2* sens et antisens (Tableau 6, page 69) et par repiquages successifs (§ 3.9, page 79). Les transformants obtenus ont été appelés respectivement BBBG130, BBG131 et BBG131B.



## 5. CULTURES DE *B. SUBTILIS* EN FIOLES D'ERLENMEYER

### 5.1. PRÉPARATION D'UN SOUCHIER

Un tube stérile contenant 5 mL de milieu LB est inoculé à partir du soucier primaire et mis à incuber à 37°C pendant 24 h sous une agitation de 300 tpm. La suspension est ensuite homogénéisée au vortex. Une dilution 1/30 de cette culture dans 50 mL de milieu LB est réalisée dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 mL et incubée à 37°C sous agitation de 200 tpm. Cette première préculture P1 est alors prélevée lors de sa phase exponentielle de croissance. La  $DO_{600nm}$  est ensuite alors mesurée comme indiquée (§ 9.3, page 111). Une nouvelle dilution 1/30 de cette culture dans 50 mL de milieu LB est réalisée dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 mL et incubée à 37°C sous agitation de 200 tpm. Cette seconde préculture P2 est alors stoppée lors de sa phase exponentielle de croissance. La culture est homogénéisée au vortex, la pureté et la qualité de P2 sont alors contrôlées par une observation au microscope et par ensemencement d'une gélose de milieu LB, complémentée en antibiotique à la concentration souhaitée (§ 2.5, page 67) dans le cas de microorganismes génétiquement modifiés et incubée à 37°C pendant 24 h.

Il est à noter que *B. subtilis* produit des colonies de formes irrégulières, de consistance crémeuse dont les contours sont ondulés et peuvent présenter des filaments, et dont le diamètre est compris entre 2 et 4 mm. Pour finir, une dilution 1/30 (v/v) de la préculture P2 est réalisée dans une fiole de 1 L contenant 100 mL de milieu LB. Cette fiole est incubée à 37°C sous une agitation de 200 tpm et la croissance est arrêtée lorsque la  $DO_{600}$  indique que la culture est en début/milieu de phase exponentielle de croissance ( $DO_{600} = 2$ ). La qualité et la pureté de la culture sont contrôlées comme indiqué pour P2. La culture est centrifugée à  $2,000 \times g$  pendant 10 min à 25°C. Les culots sont lavés à l'eau physiologique stérile puis les suspensions sont centrifugées à  $5,000 \times g$  pendant 10 min à 25°C. Les culots sont repris dans un volume de milieu LB sans antibiotique, de façon à obtenir une  $DO_{600nm}$  finale de 20 par tube. La suspension est répartie en cryotubes à raison de 0,9 mL de culture et 0,6 mL de glycérol. Les tubes sont homogénéisés au vortex et conservés à -80°C.

## 5.2. PREPARATION D'UN INOCULUM

L'inoculum est préparé à partir du souchier contenant des cellules conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans 40% de glycérol. Un tube contenant 5 mL de milieu LB est inoculé par 0,5 mL de suspension bactérienne du souchier. L'ensemble est mis à incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit sous une agitation de 300 tpm. Puis le tube est homogénéisé au vortex et la  $\text{DO}_{600}$  est mesurée. Une préculture P1 est alors inoculée à  $\text{DO}_{600} = 0,1$  dans un volume final de 50 mL de milieu approprié (LB, B, Landy, Landy MOPS) modifié à pH 7 contenue dans une fiole d'Erlenmeyer de 500 mL. Le tout est mis à incuber à la température de travail de la culture finale sous une agitation de 140 tpm, la préculture est arrêtée lorsque la souche se situe en début/milieu de phase exponentielle de croissance ( $1 < \text{DO}_{600} < 5$ ) (Cette première préculture P1 est doublée). Puis, une seconde préculture P2 est réalisée de la même manière que la préculture P1, celle-ci est inoculée à partir de la meilleure fiole de P1 et elle est doublée. Le volume nécessaire pour démarrer les cultures en fioles est alors centrifugé à  $2000 \times g$  pendant 10 min à  $25^{\circ}\text{C}$ . Le culot est remis en suspension dans de l'eau physiologique stérile. La suspension obtenue est centrifugée à nouveau à  $5000 \times g$  pendant 10 min. Le culot est enfin repris dans de l'eau physiologique stérile. La suspension est alors prête pour l'inoculation. Dans le cas d'une préparation pour l'inoculation d'un bioréacteur, le volume de P2 est de 100 mL, mis dans une fiole d'Erlenmeyer d'un litre.

## 5.3. CULTURE EN FIOLE D'ERLENMEYER.

Les expériences durent au maximum 72 h et plusieurs échantillonnages sont effectués sur ces cultures. La  $\text{DO}_{600}$  initiale est comprise entre 0,05 et 0,2 de  $\text{DO}_{600}$ . Le volume des fioles d'Erlenmeyer est de 1 L et le volume de milieu nutritif de 100 mL sauf indication contraire. On réalise sur les échantillons prélevés stérilement les mesures suivantes :

- un contrôle de la pureté par isolement sur gélose LB,
- une mesure de la densité optique à 600 nm,
- une mesure du poids sec,
- un prélèvement du surnageant de culture pour le dosage des lipopeptides par CLHP :  
3 mL de culture sont centrifugés 10 min à  $10000 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$  et le surnageant de culture est conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  avant analyse, puis à  $20^{\circ}\text{C}$ .

## 6. CULTURES DE *B. SUBTILIS* EN BIOREACTEUR

### 6.1. CULTURES DE *B. SUBTILIS* EN BIOREACTEUR

La conduite d'un ou de plusieurs bioréacteurs demande une maîtrise stricte des processus de stérilité. Tous les matériels et verreries utilisés doivent être stérilisés par autoclavage à 121°C durant 20 min. La cuve du bioréacteur contient le volume d'eau nécessaire à la dilution des solutions concentrées du milieu de Landy (§ 2.1.2, page 63), et est stérilisée par autoclavage à 121°C durant 20 min. Les connections à la platine se font stérilement à l'aide d'un bec Bunsen portatif. Le bioréacteur contenant le milieu de Landy complété en tryptophane (16 mg/L) lors de la culture de dérivés de *B. subtilis* 168 estensemencé à l'aide d'une préculture obtenue selon les conditions précédemment décrites (§ 5.2, page 93). La  $DO_{600}$  initiale est de 0,2.

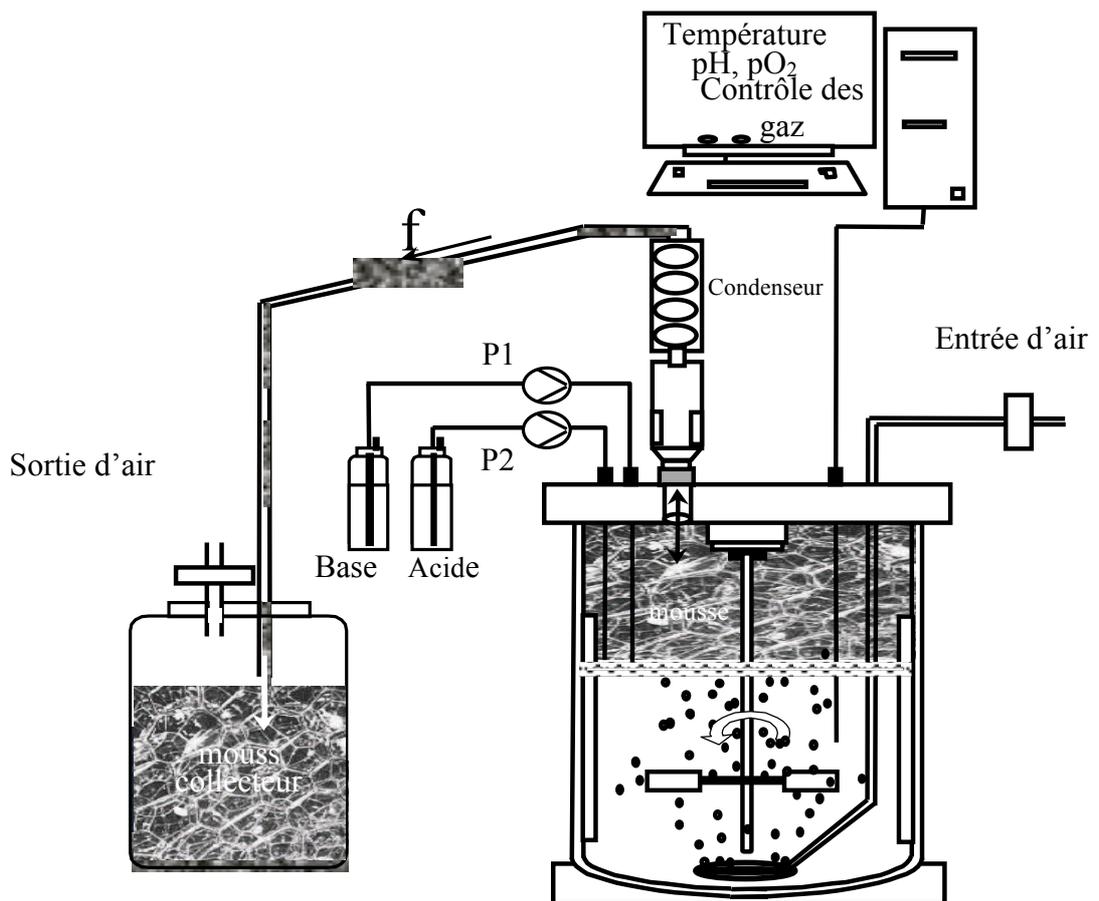


Fig. 26 Représentation schématique du bioréacteur moussant (BM)

Les bioréacteurs utilisés sont un Bioflo III et un Bioflo 3000 (Fig. 26, page 94) avec un volume utile de 3 ou 5 L (New Brunswick Scientific, Edison, U.S.A.). Sauf indication contraire, le pH est régulé à une valeur de  $7 \pm 0,1$  grâce à l'ajout contrôlé par les pompes P1 et P2 de solutions de NaOH 3 M ou de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.66 M stérilisées préalablement par autoclavage à 121°C durant 20 min. L'électrode pH est calibrée avant autoclavage de la cuve en utilisant des solutions commerciales tamponnées à pH 4,0 et 7,0 et conservées à 4°C. Le processus est conduit à 30 ou 37  $\pm 0,1$ °C et la concentration en oxygène dissous pO<sub>2</sub> est mesurée grâce à une sonde à oxygène (Mettler Toledo, Viroflay, France). L'électrolyte de la sonde à oxygène est renouvelé à chaque expérience. La sonde à oxygène est calibrée après autoclavage de la cuve lorsque le milieu de culture atteint la température et le pH de consigne de l'expérience. Le 0 % de pO<sub>2</sub> est obtenu en reliant le câble de la sonde à la masse et le 100 % pO<sub>2</sub> en saturant le milieu en air (1000 tpm et 1 vvm).

Le débit d'aération (F<sub>e</sub>) est fixé à 1 volume d'air par volume de liquide par minute (vvm), soit 3 L/min pour 3 L de milieu de Landy. L'air entrant est filtré à travers un filtre stérilisant de 0,2 µm.

Le logiciel utilisé pour la commande du processus et l'acquisition des données est AFS Biocommand (New Brunswick Scientific). La pureté de la culture est vérifiée après 48 h et en fin de culture. Des échantillons de culture d'environ 5 mL sont régulièrement prélevés et centrifugés, la densité optique et le poids sec sont déterminés, le surnageant est conservé avant analyse, comme décrit (§ 9.3, page 111). Les gaz entrants et sortants sont analysés afin d'obtenir des données sur la respiration du microorganisme. Un capteur paramagnétique permet d'analyser la quantité l'oxygène et un capteur infrarouge celle du dioxyde de carbone (Xentra 4400 ; Servomex Compagny Inc., Sugar Land, Texas, U.S.A.). L'analyseur s'intègre à un dispositif multiplexé qui permet une analyse séquentielle sur six voies, un séchage des gaz sur membrane Naflon (Permapur, Saint-Léonard, Québec) et une calibration automatique.

## 6.2. CULTURE DE *B. SUBTILIS* EN BIOREACTEUR A CONTACTEUR AIR/LIQUIDE A MEMBRANE

Pour que *B. subtilis* croisse et produise ses lipopeptides et notamment la surfactine, il faut un apport d'oxygène dans le milieu de culture. Dans un bioréacteur classique, comme expliqué dans le paragraphe précédent, cette oxygénation est réalisée par bullage.

Ce système, couplé à une forte agitation du milieu, provoque le cisaillement des bulles d'air et une formation abondante de mousse.

La production de surfactine, qu'elle soit réalisée à l'échelle pilote ou à l'échelle industrielle est donc problématique et il est dès lors nécessaire de mettre en œuvre un nouveau type de bioréacteur permettant de contrer les problèmes liés à la formation de mousse. Ce réacteur permet l'oxygénation du milieu de culture, non pas par un système de bullage mais au moyen de membranes à fibres creuses utilisées comme contacteur air/liquide (Remize et Cabassud, 2003). Les membranes utilisées comme contacteurs sont poreuses : l'oxygène nécessaire à la production de surfactine est transféré par diffusion à travers les pores de la membrane. Ce transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers la phase liquide permet ainsi d'empêcher la formation de mousse.

Les contacteurs à membrane permettent également de séparer la phase liquide de la phase gazeuse : la phase air circule d'un côté de la membrane et la phase liquide s'écoule de l'autre côté (Remize et Cabassud, 2003), sans que ces deux phases ne se mélangent. Une membrane hydrophobe garantira une meilleure séparation de ces deux phases. Toutefois, de par ses propriétés tensioactives, la surfactine peut présenter une affinité avec l'interface air/liquide, il sera donc indispensable de prendre en compte ce phénomène en vérifiant la présence de celle-ci à l'intérieur des membranes contacteur utilisées.

Tableau 8 Caractéristiques des bioréacteurs étudiés et conditions de fermentation

Caractéristiques	Bioréacteur Moussant (BM)	Bioréacteur sans bulles (BB1)	Bioréacteur sans bulles (BB2)	Bioréacteur sans bulles (BB3)
Fournisseur	-	GE-Healthcare	MEDOS	Spectrum Labs
Surface (m <sup>2</sup> )	-	2,50	1,90	0,37
Taille des pores (µm)	-	0,65	0,20	0,05
Composition des fibres	-	Polyéthersulfone	Polypropylène	Polypropylène
Structure	-	Module externe	Module externe	Fibres immergées
Agitation (tpm)	160	160	160	500
Aération (vvm)	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume de milieu (l)	3,0	3,0	3,0	2,5
Débit du milieu (l min <sup>-1</sup> )	-	1,0	1,0	-
Compartiment de l'air	-	Extérieur des fibres	Intérieur des fibres	Intérieur des fibres
Température (°C)	30	30	30	30

Pour réaliser ce couplage, de nombreux types de membrane pouvant être utilisés, le choix a été fait dans ces travaux de n'utiliser que des membranes en fibres creuses plutôt hydrophobes. Ces membranes pouvant être extérieures au bioréacteur ou immergées dans celui-ci.

Quatre bioréacteurs ont été mis en œuvre, le premier étant un bioréacteur avec une aération classique par bullage où il y a formation de mousse (appelé BM pour « Bioréacteur Moussant»; § 6.1, page 94), les autres sont aérés par un contacteur air/liquide à membrane (appelés BB pour « Bioréacteur sans bulles = Bubbleless Bioreactor»). Le détail des conditions opératoires est décrit dans le Tableau 8, page 96.

#### 6.2.1. Les contacteurs air/liquide à membrane externes

Les membranes utilisées dans ce cas sont constituées d'un module externe comprenant deux compartiments, un à l'intérieur des fibres et l'autre à l'extérieur de ces dernières. Le milieu de culture circule dans l'un ou l'autre de ces compartiments, entraîné par une pompe péristaltique. L'air circule dans l'autre compartiment sous pression ou pas. Deux types de bioréacteur sans bulles (BB) ont été mis en œuvre avec un module externe (Fig. 27, page 98) qui est raccordé à la cuve du bioréacteur par des canules plongeant dans le milieu de culture. Ces deux membranes sont stériles, celle de 2,5 m<sup>2</sup> provenant de GE-Healthcare est stérilisée avant utilisation par autoclavage à 121°C pendant 20 min. L'autre de 1,9 m<sup>2</sup>, provenant de MEDOS (Hillite 7000, MEDOS Medizintechnik AG, Stolberg, Allemagne) est à usage unique et arrive dans un emballage stérile, elle a été préalablement stérilisée aux rayons gamma.

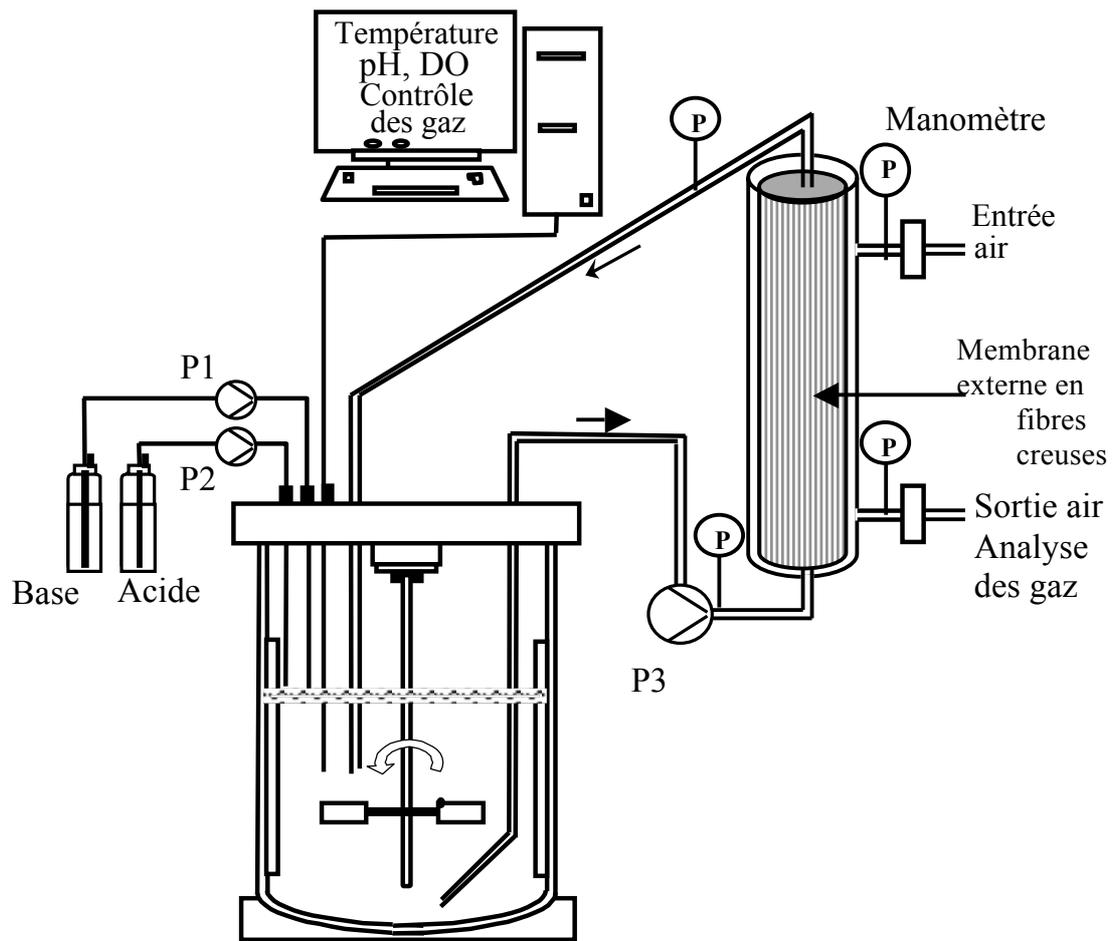


Fig. 27 Représentation schématique du bioréacteur sans bulles utilisant un contacteur air/liquide à membrane externe en fibres creuses

### 6.2.2. Le contacteur air/liquide à membrane interne

La membrane utilisée dans ce cas est constituée d'un ensemble de fibres de polypropylène immergées dans la cuve. L'air circule dans les fibres. Le détail des conditions opératoires est décrit dans le Tableau 8 (page 96) et la représentation de ce procédé est détaillée ci-dessous (Fig. 28, page 99). Cette membrane est fournie par Spectrum Labs (JM Separations, HG Eindhoven, Pays-Bas), elle possède une surface de  $0,375 \text{ m}^2$  et une taille de pores de  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ . L'entrée et la sortie d'air de la membrane sont connectées sur la platine. La membrane est stérilisée dans la cuve avant utilisation par autoclavage à  $121^\circ\text{C}$  pendant 20 min.

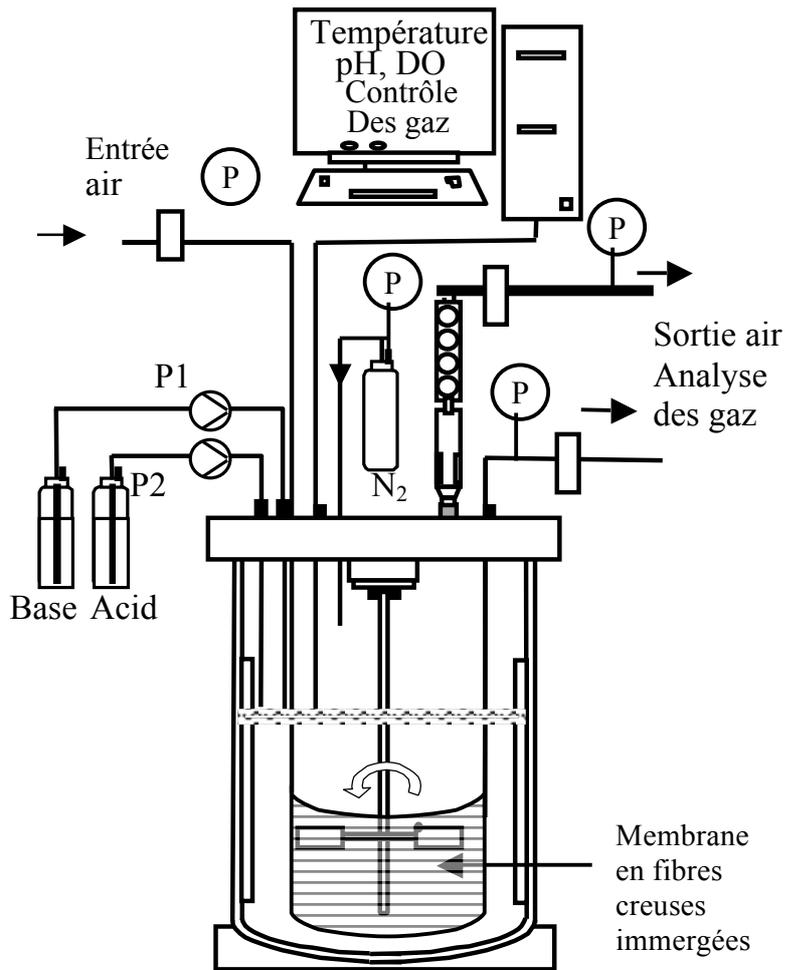


Fig. 28 Représentation schématique du bioréacteur sans bulles utilisant une membrane immergée en fibres creuses

### 6.2.3. Le lavage et le stockage des contacteurs air/liquide à membrane

Compte tenu de l'affinité de la surfactine pour les interfaces, le protocole de lavage des membranes a été étudié et optimisé. Il tient compte de la nature des membranes et il est en accord avec les récents travaux publiés sur ce sujet (Chen et Juang, 2007; Chen *et al.*, 2008a). Ces lavages ne doivent pas dénaturer le lipopeptide ni la membrane. L'utilisation de solvants est proscrite bien que certains, comme le méthanol, soient très efficaces pour décrocher les lipopeptides. Des tests de sensibilité au pH ont permis de déterminer qu'un pH=10 est la limite de dégradabilité de la surfactine. Les lavages sont effectués dans les conditions d'agitation de la fermentation. Le protocole se déroule en sept étapes de lavage à base d'eau. Deux lavages sont réalisés avec 3 L d'eau distillée à 30°C pendant 30 min, ils permettent de décrocher la biomasse faiblement fixée. Le deuxième lavage à l'eau distillée à 30°C permet de réaliser une mesure du coefficient de transfert d'oxygène.

Deux lavages sont réalisés avec 3 L de NaOH 0,1 M à 50°C pendant 1 h ; ils permettent de décrocher la biomasse fortement fixée et de désorber la majorité de la surfactine.

La membrane est alors régénérée avec une solution de NaOH 0,5 M à 50°C pendant une heure puis avec une solution de NaOCl 100 ppm à 50°C pendant une heure, puis nettoyée à l'eau distillée à température ambiante jusqu'à atteindre la neutralité dans la membrane.

### 6.3. COUPLAGE D'UN SYSTÈME D'EXTRACTION/CONCENTRATION DES LIPOPEPTIDES A UN BIOREACTEUR A CONTACTEUR AIR/LIQUIDE A MEMBRANE

Le procédé mis en œuvre ici a pour objet la production, l'extraction et la purification en continu et sans mousse des lipopeptides de *B. subtilis*, mais il pourrait être utilisé pour d'autres types de biosurfactants produits par des microorganismes aérobies. Ce procédé réside sur le couplage du bioréacteur sans bulles (BB), que nous avons décrit précédemment (§ 6.2, page 95), à un système d'extraction par microfiltration et de concentration par ultrafiltration (Fig. 29, page 101). Ce dispositif se différencie des procédés et dispositifs connus de dégradation biologique de matières organiques par des microorganismes qui excrètent des biosurfactants par le fait que, dans ce cas, 95% des biosurfactants produits restent dans le milieu de culture sans la moindre formation de mousse (5% s'adsorbent à l'interface air/liquide du contacteur à membrane mais peuvent être désorbés lors du lavage de la membrane à la soude pH=10 à 50°C).

Ils sont ensuite séparés des cellules de microorganisme par microfiltration et concentrés en phase aqueuse par ultrafiltration, ce qui permet d'obtenir par tout procédé connu, des biosurfactants utilisables dans les industries alimentaires, pharmaceutiques, pétrolières, cosmétiques et phytosanitaires.

La représentation schématique de ce procédé intégré est réalisée (Fig. 29, page 101). Celui-ci sera détaillé selon les trois points suivants : en premier les dispositifs permettant la culture en continu de *B. subtilis* ; puis la séparation du bouillon de fermentation et des cellules par microfiltration et enfin la concentration des lipopeptides produits et extraits par une étape d'ultrafiltration.

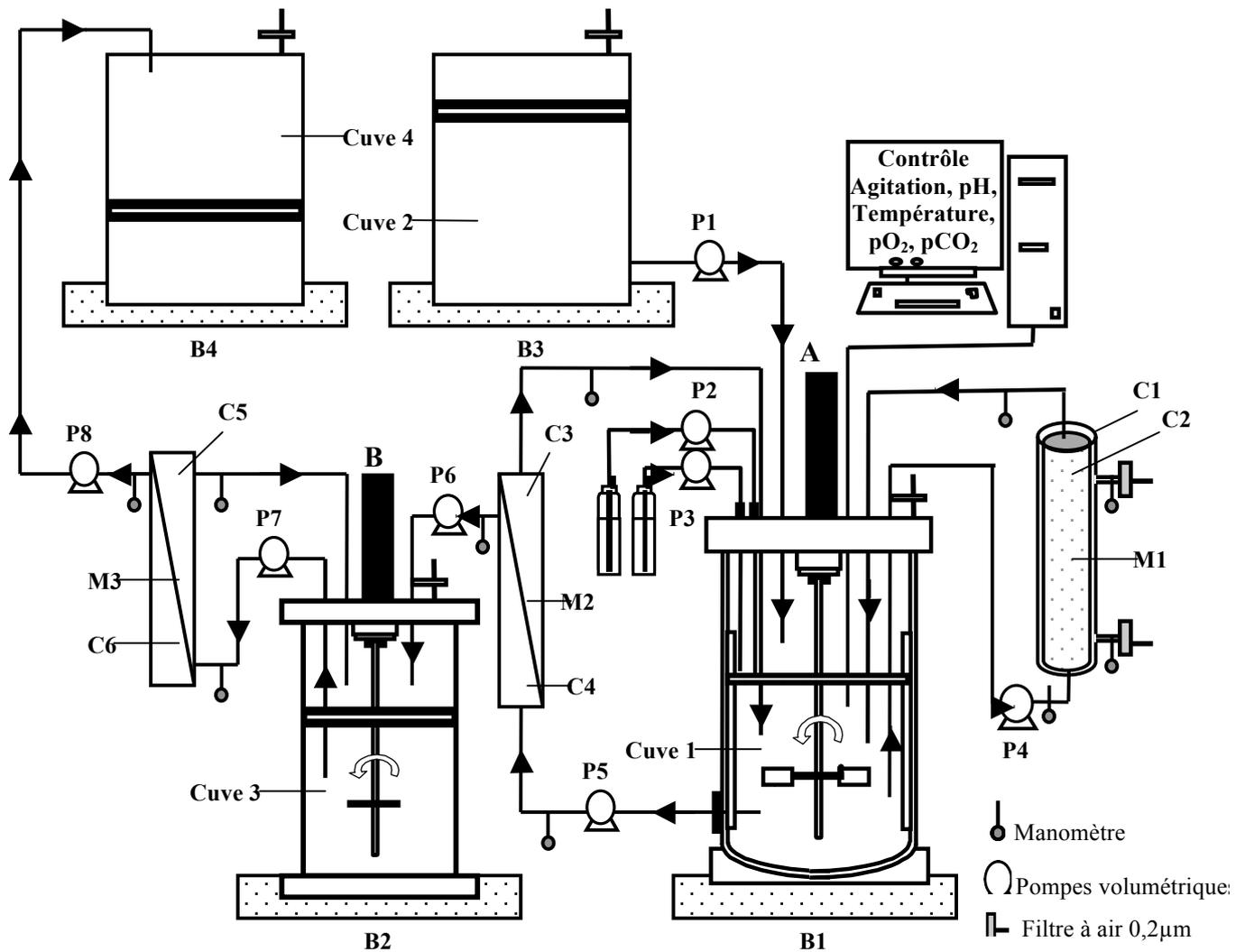


Fig. 29 Représentation schématique du bioréacteur sans bulles utilisant un contacteur à membrane externe en fibres creuses dans un procédé continu de production, d'extraction et de purification des lipopeptides produits par *B. subtilis*. B : Balance ; M : Moteur d'agitation ; P : Pompes volumétriques ; C : Compartiment

### 6.3.1. Culture continue de *B. subtilis* en bioréacteur à contacteur air/liquide à membrane

Le dispositif employé pour la culture en continu de *B. subtilis* est du type connu. Il comporte un réacteur agité (**Cuve 1**) dans lequel sont cultivés sur un substrat organique en phase aqueuse (ici le milieu de Landy) des microorganismes (ici *B. subtilis*) qui dégradent ledit substrat en excréant des biosurfactants, ainsi que des moyens pour alimenter et soutirer en continu dans le réacteur un débit déterminé dudit substrat (Fig. 30, page 104).

Le bioréacteur est caractérisé par la présence d'un dispositif, qui apporte dans un environnement stérile, l'oxygène nécessaire à la croissance du microorganisme dans le milieu de culture, grâce à la diffusion de l'oxygène à travers les pores d'un contacteur air/liquide à membrane **M1** en fibres creuses, comme décrit précédemment (§1.6.2.2, page 52; § 6.2, page 95). Une pompe péristaltique **P1** permet d'alimenter en continu à un débit  $F_1$  la cuve du bioréacteur en milieu de Landy frais, de même une pompe péristaltique **P5** permet de soutirer en continu le milieu de culture du bioréacteur à un débit  $F_2$ . Par ailleurs, la cuve 1 du bioréacteur est placée sur une balance **B1** et c'est cette dernière qui contrôle le débit de **P1**, en permettant de maintenir un volume constant à l'intérieur de la **cuve 1** et de ce fait d'obtenir  $F_1 = F_2$ . Dans chacune des expériences réalisées le taux de dilution est changé après au moins le passage de quatre volumes de la cuve 1. L'inoculum et les conditions de fermentation restent équivalentes à celles du batch, comme décrit précédemment (§ 5.2, page 93). Afin de maintenir l'environnement stérile, l'ensemble des constituants du dispositif ainsi que les différentes membranes utilisées sont stérilisés à 121°C pendant 20 min.

Une caractéristique de ce procédé tient dans le fait que l'on recycle la totalité des cellules de microorganisme après les avoir débarrassées des résidus de matières organiques et des biosurfactants, ce qui permet d'obtenir un taux élevé de croissance des microorganismes dans le bioréacteur. La description suivante se réfère au schéma page 101, qui représente, sans aucun caractère limitatif, un exemple de réalisation d'un procédé pour produire et extraire en continu des biosurfactants par fermentation de microorganismes dans un réacteur. Il est précisé que le procédé décrit ici peut s'appliquer à tout substrat organique et à tout type de microorganisme (bactéries, levures ou champignons), susceptibles de dégrader ces substrats en produisant des biosurfactants. Le procédé peut comprendre au moins un réacteur représenté par une **Cuve 1** dans laquelle le microorganisme croît dans un milieu de culture agité par un moteur **A** de 0 à 500 tpm et thermostaté à une température de culture choisie et constante allant de 0°C à 70°C, de préférence de l'ordre de 25 à 37°C. Le pH étant régulé par ajout d'acide par la pompe volumétrique **P2** ou de base par la pompe volumétrique **P3**, il peut être compris entre 6 et 8. Le procédé comporte aussi un contacteur air/liquide à membrane **M1** externe, couplée à la **Cuve 1**, dans laquelle circule dans un compartiment **C1**, à un débit déterminé, un gaz stérile contenant de l'oxygène et dans un compartiment **C2** le milieu de culture contenant les cellules à un débit préférentiellement de 60 L/h imposé par la pompe volumétrique **P4**. Les débits du gaz et du milieu de culture sont déterminés en fonction de l'apport d'oxygène souhaité.

Selon une variante de ce procédé qui a été décrite précédemment, le contacteur air/liquide à membrane **M1** peut être immergé dans le bioréacteur (**Cuve 1**), l'oxygène étant diffusé du compartiment **C1** directement dans le réacteur (**Cuve 1**) sans la formation de bulles. Dans ce cas la vitesse d'agitation du milieu de culture dans la **Cuve 1** fait varier le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène.

### 6.3.2. L'extraction des lipopeptides et le recyclage des cellules par microfiltration

Le procédé décrit précédemment est donc caractérisé par le fait qu'il comporte des moyens de microfiltration et d'ultrafiltration tangentielle situés en sortie du bioréacteur qui séparent le liquide en plusieurs fractions. Il y a une première étape de microfiltration sur une membrane **M2** en fibres creuses de polyéthersulfone de taille de pores 0,2  $\mu\text{m}$  (GE-Healthcare), dans laquelle le milieu de culture contenant les cellules circule, grâce à une pompe volumétrique **P5**, dans le compartiment **C3** appelé rétentat. Sous l'effet d'une pompe volumétrique **P6** le milieu passe par filtration tangentielle à travers les pores de la membrane **M2** vers le compartiment **C4**. Par ce biais, le milieu de culture contenant les biosurfactants est débarrassé des cellules et est extrait puis recueilli dans une **Cuve 3** agitée par un moteur **B**. Comme mentionné plus haut, le milieu de culture du bioréacteur est prélevé en continu vers la **Cuve 3**. Pour compenser ce soutirage et garder un volume constant dans le réacteur (**Cuve 1**), une pompe **P1** alimente le bioréacteur en milieu neuf contenu dans la **Cuve 2**. De plus, les débits des pompes **P1** et **P6** sont égaux et réglés pour obtenir dans le réacteur (**Cuve 1**) un taux de dilution compris entre 0,05 et 0,5  $\text{h}^{-1}$  et, de préférence, de l'ordre de 0,1  $\text{h}^{-1}$ , c'est à dire un débit horaire égal à 0,1 fois le volume de la phase aqueuse contenue dans la **Cuve 1**.

### 6.3.3. La concentration des lipopeptides par ultrafiltration

Comme nous l'avons décrit dans la synthèse bibliographique, les lipopeptides de *B. subtilis* peuvent être concentrés et purifiés par ultrafiltration (§ 1.7, page 54). Cette technologie a donc aussi été utilisée dans notre procédé afin de réaliser la concentration des lipopeptides produits.

Le filtrat contenu dans la **Cuve 3** est enfin entraîné, grâce à une pompe **P7** dans le compartiment **C5** d'une membrane d'ultrafiltration **M3** de seuil de coupure de 10 KDa en cellulose régénérée (Sartorius, Göttingen, Allemagne). Au-dessus de la concentration micellaire critique les biosurfactants sont concentrés dans le compartiment **C5**, appelé rétentat et retournent ainsi dans la **Cuve 3**. Le milieu de culture est extrait, sous le contrôle d'une pompe **P8** à un débit équivalent à celui de la pompe **P6**, vers un compartiment **C6**, appelé ultrafiltrat, et recueilli dans une **Cuve 4**. Ce débit sera fonction du débit imposé par la pompe **P6** et régulé grâce aux informations collectées par les différentes balances **B1**, **B2**, **B3** et **B4**.

Le couplage en continu de ces trois membranes à un réacteur pour la production de biosurfactants en continu est une première et n'a jamais été décrit précédemment.

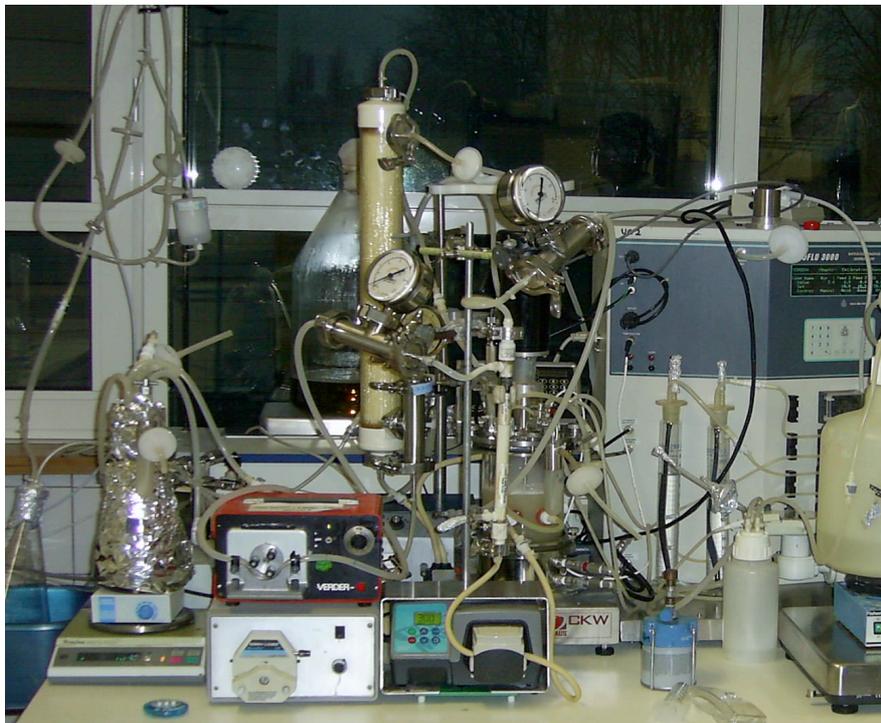


Fig. 30 Photographie d'un procédé continu de production, d'extraction et de purification de lipopeptides de *B. subtilis*. Expérience réalisée au laboratoire avec un contacteur air/liquide à membrane externe.

#### 6.3.4. Le lavage et le stockage des membranes de filtration

Les membranes de microfiltration et d'ultrafiltration sont nettoyées après utilisation selon le protocole de lavage décrit précédemment (§ 6.2.3, page 99). Le deuxième lavage sert ici à réaliser le débit standard en eau de la membrane (§ 9.7, page 115). La membrane de microfiltration est régénérée selon le protocole défini ; par contre, la membrane d'ultrafiltration est régénérée avec une solution de soude NaOH 0,1 M à 50°C. Les membranes sont stockées à 4°C, la membrane d'ultrafiltration est stockée dans de l'éthanol à 20% (v/v).

### 7. PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES

La purification des lipopeptides qui est développée dans ces travaux repose sur l'enchaînement d'étapes de filtration à travers une membrane en cellulose régénérée. Cette purification s'effectue sur un milieu de culture débarrassé de cellules soit par centrifugation 15 min à  $12000 \times g$ , soit par microfiltration sur une membrane en fibres creuses de polyéthersulfone de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Ces étapes sont l'ultrafiltration, la diafiltration, l'ultrafiltration en présence de MeOH et l'évaporation. Une étape de lyophilisation peut être ajoutée pour améliorer la conservation du produit. A la fin de chaque étape, des échantillons sont prélevés du côté filtrat et du côté rétentat. Ainsi le bilan de la purification peut être établi. Celui-ci permet de déterminer les pertes en surfactine provoquées par les étapes d'ultrafiltration et de diafiltration, en faisant le rapport de la quantité de surfactine concentrée obtenue après ultrafiltration et de la quantité de surfactine initiale.

#### 7.1. CONCENTRATION DES LIPOPEPTIDES PAR ULTRAFILTRATION

L'étape d'ultrafiltration consiste à filtrer le bouillon de culture débarrassé des cellules après microfiltration sur membrane 0,2  $\mu\text{m}$  ou après centrifugation  $12000 \times g$  pendant 15 min. Cette étape vise à éliminer du bouillon de culture une grande partie des substances résiduelles telles que le glucose, le glutamate et les différents métabolites primaires.

La formation de micelles et de complexes micellaires par la surfactine, quand elle se trouve au-dessus de sa CMC, permet de la retenir et donc de la concentrer dans le rétentat, grâce à l'utilisation d'une membrane d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 10 KDa (Millipore, Molsheim, France). Cette étape se déroule à température ambiante et sous une pression de 0,5 bar. Durant cette étape, nous avons veillé à conserver un volume de 10% (v/v) du volume total de bouillon de culture du côté rétentat, et ceci dans le but de réaliser les quatre étapes de diafiltration ultérieures.

## 7.2. PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES PAR DIAFILTRATION

Pour débiter l'étape de diafiltration, le volume de bouillon de culture se trouvant du côté rétentat a été complété d'eau déminéralisée jusqu'à un volume final de 2 L. Cette étape, qui permet de diluer le bouillon de culture afin de faciliter le passage des substances résiduelles à travers la membrane, est réalisée quatre fois en veillant à laisser un volume de 10% (v/v) du volume total de bouillon de culture dilué du côté rétentat, comme pour l'étape d'ultrafiltration. Une étape finale d'ultrafiltration, en présence de méthanol à 70% (v/v), permet de réaliser l'extraction de la surfactine. Le méthanol est ajouté dans le bouillon de culture dilué restant du côté rétentat. Cette étape va permettre la destruction des micelles et le passage des monomères de lipopeptide à travers les pores de la membrane. Après filtration, nous obtenons une solution constituée de surfactine et de méthanol à 70% du côté filtrat.

## 7.3. CONCENTRATION DES LIPOPEPTIDES PAR ÉVAPORATION

La solution issue de la purification par ultrafiltration sera ensuite placée au Rotavapor VV2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co, Schwabach, Allemagne) afin de concentrer la surfactine en retirant tout le méthanol et une partie de l'eau. Cette évaporation s'effectue sous un vide de -1 bar et à 40°C. Cette étape dure plusieurs heures et doit s'effectuer sous surveillance car la mise sous vide de l'enceinte va entraîner le dégazage de la solution et peut provoquer un fort moussage.

#### 7.4. LYOPHILISATION DES LIPOPEPTIDES

La lyophilisation des lipopeptides est effectuée directement à partir de la solution concentrée issue de l'évaporation. Celle-ci est d'abord congelée à -20°C, puis lyophilisée grâce à un lyophilisateur Heto Power Dry PL 9000 (Jouan Nordic, Allerod, Danemark), selon les étapes suivantes : 1 h à -30°C ; 5 h à -10°C ; 5 h à 0°C ; 5 h à -20°C ; 5 h à 35°C. La lyophilisation s'effectue sous une pression résiduelle de 15 mbar.

### 8. ETUDES DE L'ADSORPTION DE LA SURFACTINE

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la surfactine est un composé tensioactif puissant, qui a un comportement aux interfaces très particulier qui a fait l'objet de nombreuses études et notamment à l'interface air/liquide (Ishigami *et al.*, 1995; Deleu *et al.*, 1999a; Deleu *et al.*, 1999b; Shen *et al.*, 2009). L'utilisation de contacteur air/liquide à membrane et de membrane de filtration lors de procédés de production de la surfactine nécessite la vérification et la compréhension de ces comportements. Afin de mener l'étude de l'adsorption de la surfactine sur des membranes en fibres creuses, nous disposons en plus des membranes décrites précédemment du système QuixStand (GE Healthcare) et de deux membranes de microfiltration en polyéthersulfone : une membrane utilisée en microfiltration d'une taille de pores de 0,2 µm et d'une surface de 0,110 m<sup>2</sup> (GE Healthcare) et une membrane utilisée comme contacteur air/liquide d'une taille de pores de 0,65 µm et d'une surface de 0,120 m<sup>2</sup> (GE Healthcare). Le but de cette étude est de mesurer les cinétiques d'adsorption de la surfactine au contact des membranes utilisées comme contacteur air/liquide et pour la microfiltration en continu du milieu de culture.

Pour chacune des expériences, la quantité de surfactine adsorbée ( $M_t$ ) est calculée selon l'équation (2) ci-dessous, avec  $V$ , le volume;  $C_0$ , la concentration initiale en surfactine,  $C_t$ , la concentration en fonction du temps;  $A$ , l'aire de la membrane.

$$M_t = \frac{V \times (C_0 - C_t)}{A} \quad (2)$$

### 8.1. ADSORPTION DE LA SURFACTINE SUR LES CONTACTEURS A MEMBRANE LORS D'UN CONTACT AIR/LIQUIDE

Deux études complémentaires ont été réalisées. La première sur les membranes contacteurs utilisées lors des fermentations. L'autre sur le système QuixStand afin d'évaluer l'influence de la taille des pores sur l'adsorption de la surfactine. Le principe est représenté ci-dessous (Fig. 31, page 108).

La première étude est menée dans les mêmes conditions que les fermentations (Tableau 8, page 96), le milieu de culture étant remplacé par une solution de surfactine purifiée à  $200 \pm 10$  mg/L dans de l'eau distillée à 30°C, le pH est ajusté à pH 7 avec une solution de NaOH 1M. La seconde étude est réalisée avec une solution de surfactine purifiée comme nous l'avons décrit précédemment dont la concentration est de 100 mg/L. Des membranes de petite taille ( $0,11$  m<sup>2</sup>), de taille de pores de  $0,65$   $\mu$ m et  $0,2$   $\mu$ m, servant de contacteurs air/liquide, sont utilisées.

Pour ces expériences, il est nécessaire d'injecter de l'air à l'entrée de la membrane à une pression de 0,5 bar et à un débit correspondant à 1 vvm. La solution de surfactine circule dans les fibres creuses avec un débit de 1 L/min.

L'adsorption de la surfactine à la surface des fibres est étudiée à pH 7 en fonction du temps, et à 20°C, 30°C et 40°C. Un prélèvement de 2 mL est pris dans le rétentat toutes les minutes durant 10 min, puis toutes les 5 min pendant 20 min. Chaque échantillon est ensuite filtré sur une membrane  $0,2$   $\mu$ m et dosé par CLHP afin d'obtenir les cinétiques d'adsorption de la surfactine aux températures définies.

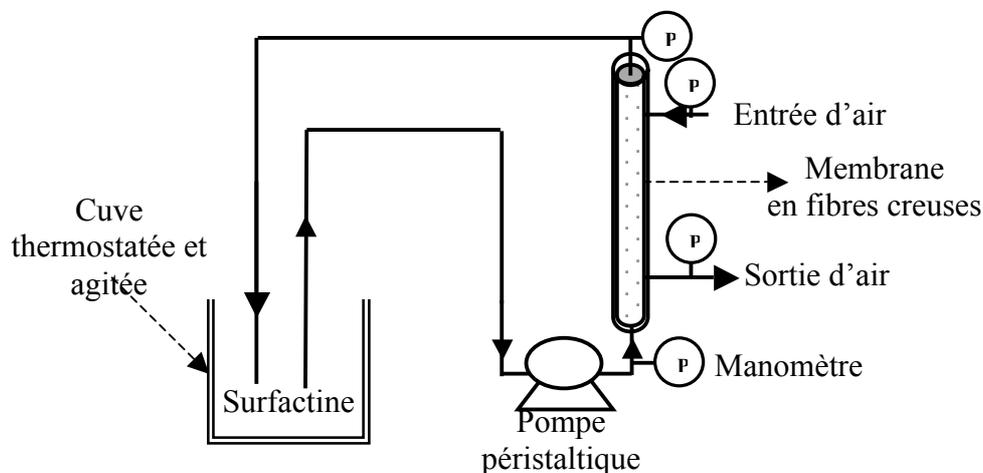


Fig. 31 Représentation schématique du système QuixStand utilisé pour l'analyse de l'adsorption de la surfactine à l'interface air/liquide d'un contacteur à membrane en fibres creuses.

## 8.2. ADSORPTION DE LA SURFACTINE SUR UNE MEMBRANE EXTRACTRICE LIQUIDE/LIQUIDE

Dans le cadre de cette étude, les membranes utilisées sont les mêmes que celles précédemment décrites ; elles sont toutefois utilisées en microfiltration. Pour chacune des expériences à réaliser, l'adsorption est étudiée durant 30 min en bloquant le filtrat puis pendant 30 min en filtrant.

Les expériences nécessaires à cette étude sont réalisées avec une solution de surfactine dont la concentration initiale est de 100 mg/L. Le débit de circulation de la solution de surfactine dans le système est de 1 L/min et le débit de filtration est maintenu constant à 30 mL/min par une pompe péristaltique. Les expériences sont réalisées à pression atmosphérique. Le principe est représenté ci-dessous (Fig. 32, page 109).

Une partie de cette étude consiste à analyser l'adsorption de la surfactine à pH 7 en fonction du temps à 20°C, 30°C et 40°C. Un prélèvement de 2 mL est pris dans le rétentat et dans le filtrat toutes les minutes durant 10 min, ensuite toutes les 5 min pendant 20 min. Un prélèvement de 2 mL est également effectué dans le rétentat final et dans le filtrat final.

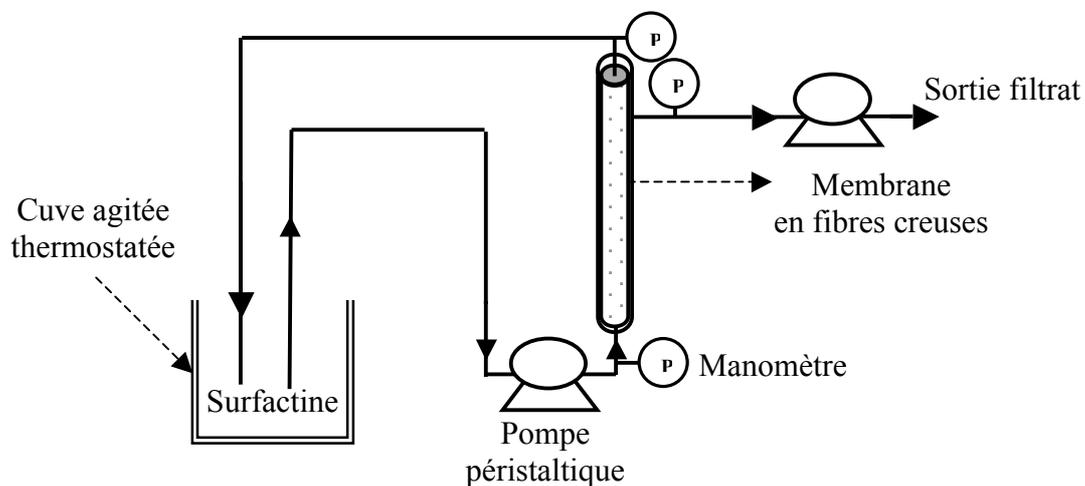


Fig. 32 Représentation schématique du système QuixStand utilisé pour l'analyse de l'adsorption de la surfactine à l'interface liquide/liquide d'une membrane de microfiltration en fibres creuses.

Les prélèvements réalisés dans le rétentat final et dans la solution filtrée permettent d'effectuer un bilan des quantités de surfactine se trouvant dans chaque compartiment et d'en déduire la quantité de surfactine adsorbée sur la membrane. Il est donc nécessaire de prendre note du volume du rétentat final et du filtrat final à chaque manipulation.

Après chaque manipulation afin de réaliser l'étude de l'adsorption de la surfactine sur des membranes en fibres creuses, les membranes subissent les lavages comme décrit précédemment (§ 6.3.4, page 105).

## 9. ANALYSES

### 9.1. MESURE DE L'ACTIVITÉ $\beta$ -GALACTOSIDASE

La mesure de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est un test très employé en biologie moléculaire, il a été défini par Miller en 1972. Il permet de quantifier l'expression d'un gène fusionné au gène *lacZ*, ce dernier codant pour l'enzyme. Dans ces travaux, le test a été employé pour vérifier et quantifier la force des promoteurs  $P_{srfA}$  et  $P_{repU}$ . Pour réaliser ce test, les cellules sont mises en culture dans les conditions de production des lipopeptides (§ 5.3, page 93). Un millilitre de culture cellulaire est prélevé dans un microtube Eppendorf de 1,5 mL et centrifugé 2 min à  $12000 \times g$ , puis le culot cellulaire est congelé à  $-20^\circ\text{C}$  pendant 1 h. Celui-ci est ensuite repris dans 0,5 mL de Tampon Z (phosphate de Na 100 mM pH=7 ; KCl 10 mM ;  $\text{MgSO}_4$  1 mM ;  $\beta$ -mercaptoéthanol, 50 mM). Les cellules sont conservées dans la glace et lysées avec 30  $\mu\text{L}$  de chloroforme sous forte agitation pendant 15 s. Le tube Eppendorf est incubé à  $37^\circ\text{C}$  pendant 5 min ainsi que la solution d'ONPG (13 mM). L'ONPG est ensuite ajouté à raison de 0,2 mL par tube, le temps de réaction est alors mesuré. La réaction est arrêtée en ajoutant 0,5 mL de carbonate de Na (1 M) après l'apparition de la coloration jaune. Les échantillons sont centrifugés 2 min à  $12000 \times g$ , puis l'absorbance à 420 nm du surnageant est mesurée. L'activité  $\beta$ -galactosidase est déterminée en unités Miller selon l'équation 3 suivante :

$$\text{Activité (Unités Miller)} = 1000 \times \text{DO}_{420\text{nm}} / T(\text{min}) \times \text{volume cellulaire} \times \text{DO}_{600\text{nm}} \quad (3)$$

Une unité Miller = 1 nmole d'ONP libérée/min à  $37^\circ\text{C}$ .

## 9.2. MESURE DE LA SPORULATION

Ce test, défini en 1969 (Sterlini et Mandelstam, 1969), repose sur un stress nutritif des cellules qui sont cultivées d'abord dans un milieu de culture dit « riche » puis transférées dans un milieu dit « pauvre » (§ 2.3, page 65). Ce transfert provoque alors un stress de la cellule de *B. subtilis* qui enclenche alors son processus de sporulation. Pour cela les bactéries provenant d'un soucier stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sont étalées sur boîte de LB et mises en culture une nuit à  $35^{\circ}\text{C}$ . Puis 10 mL du milieu riche de Sterlini-Mandelstam sontensemencés à  $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,05$  et incubés à  $35^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Après 3 h un prélèvement de 500  $\mu\text{L}$  est effectué et une lecture d'absorbance est effectuée (dilution 1/2). Une fois la  $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,7$  atteinte, les 9,5 mL de culture sont centrifugés 10 min à  $5000 \times g$  et le culot est suspendu dans 10 mL du milieu dit « pauvre » et incubé à  $35^{\circ}\text{C}$  sous agitation. Le temps 0 de la manipulation est alors défini.

Des échantillons de 400  $\mu\text{L}$  sont prélevés à intervalles réguliers. Ces 400  $\mu\text{L}$  sont alors divisés en 2 échantillons V et S. Les échantillons V et S sont dilués dans 9,8 mL de milieu Spizizen Minimum Salts (dilution  $2 \times 10^{-2}$ ), puis 1 mL est repris de cette précédente dilution et dilué dans 9 mL de Spizizen Minimum Salts (dilution  $2 \times 10^{-3}$ ). 250  $\mu\text{L}$  de chaque dilution de V sont étalés sur LB gélosé en trois exemplaires et incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  durant une nuit. Les dilutions de S sont traitées 15 min à  $85^{\circ}\text{C}$ , dans le but de détruire par choc thermique les cellules végétatives. 250  $\mu\text{L}$  de ces échantillons traités à  $85^{\circ}\text{C}$  sont étalés sur LB gélosé en trois exemplaires et incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant une nuit. Les colonies sont dénombrées sur les boîtes S et V. Le rapport S/V est calculé afin d'estimer le pourcentage de sporulation en fonction du temps.

## 9.3. MESURE DE LA BIOMASSE

La mesure de la biomasse peut être effectuée selon deux méthodes. La première méthode consiste à mesurer la densité optique (DO) à une longueur d'onde de 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre SECOMAN Prim (SECOMAN, Domont, France).

La deuxième méthode employée est celle du poids sec. Elle consiste à mesurer la quantité de matière sèche contenue dans un échantillon. Le récipient servant à la mesure du poids sec est placé préalablement à  $105^{\circ}\text{C}$  durant 48 h, puis il est refroidi 4 h en dessiccateur avant d'être pesé.

5 à 10 mL de culture, préalablement homogénéisés, sont centrifugés à  $10000 \times g$  durant 10 min. Les culots sont repris et lavés avec 10 mL d'eau déminéralisée et sont à nouveau centrifugés 10 min à  $10\,000 \times g$ . Le culot peut alors être conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  si la mesure ne peut être réalisée immédiatement. Chaque culot est repris par de l'eau déminéralisée et placé quantitativement dans le récipient pré-taré. Le tout est placé à  $105^{\circ}\text{C}$  pendant 48 h. Après un refroidissement de 4 h en dessiccateur, la pesée se réalise sur une balance de précision.

#### 9.4. PURIFICATION ET QUANTIFICATION DES LIPOPEPTIDES

##### 9.4.1. Sonication des cellules

Pour vérifier qu'il n'y a pas de lipopeptides retenus dans le culot cellulaire lors de la centrifugation des échantillons, des culots cellulaires sont récupérés après centrifugation de 2 mL d'échantillon. Le protocole de sonication nécessite la préparation de 2 solutions A et B, dont la composition est la suivante :

Tampon A : Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 0,2 M; EDTA 1 mM; Lysozyme 5 mg/mL.  
Tampon B : DNase 10 mg/mL; RNase 5 mg/mL.

Le protocole est le suivant : le culot cellulaire est repris dans 1 mL de tampon A et incubé 15 min à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis incubé 15 min dans de la glace. Enfin, il subit une sonication dans la glace pendant 1 min à 6 W (Ultrasonic processor, Bioblock Scientific, Illkirch, France). 1 mL de tampon B est alors ajouté et le tout est incubé 15 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Deux sonications dans la glace pendant 1 min à 6 W sont effectuées, puis le tout est centrifugé pendant 10 min à  $10\,000 \times g$  et le surnageant est conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse CLHP.

##### 9.4.2. Purification des lipopeptides

Deux types de préparation des échantillons ont été effectués dans ces travaux. Soit le surnageant issu de la centrifugation du bouillon de culture est purifié sur une cartouche C18, soit il est simplement filtré à travers une membrane de porosité  $0,2 \mu\text{m}$  puis dilué 10 à 30 fois dans du méthanol 100% (cette méthode peut être employée si la concentration de l'échantillon dépasse les 200 mg/L).

La purification des lipopeptides est réalisée sur des cartouches d'un g de gel C18 Maxiclean (Alltech, Templemars, France). La cartouche d'un g d'ODS est conditionnée avec 20 mL de méthanol 100%, puis rincée par 8 mL d'eau milli-Q. 1 mL de surnageant de culture dont le pH est égal à 7 +/-0.5, est alors chargé sur la colonne. La cartouche est lavée avec 8 mL d'eau milli-Q. Après séchage de la cartouche avec 20 mL d'air, les lipopeptides sont élués par 6 mL de méthanol 100%. L'éluat est porté à sec à l'aide d'un concentrateur sous vide (Speed Vac Plus SC110A, Savant, GMI, Ramsey, U.S.A.). L'échantillon est par la suite repris dans 250 µL de méthanol 100% à 4°C pour permettre le dosage en CLHP.

#### 9.4.3. Analyse par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

L'échantillon est analysé grâce à un système complet de CLHP de la marque Waters (Online Degaser, 717 Autosampler, 660S Controller, 626 Pump, 2996 PhotoDiodeArray ; Waters Corporation, Milford, MA, U.S.A.) en employant une colonne C18 (5 µm, 250 x 2,5 mm, VYDAC 218 TP ; Grace, Deerfield, Illinois, U.S.A.). Deux dosages sont effectués. Le premier dosage est celui des surfactines : 10 µL d'échantillon purifié ou filtré sont injectés à un débit de 0,6 mL/min et confrontés à un standard externe de surfactine à 500 mg/L (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.). L'élution est réalisée pendant 20 min en mode isocratique à l'aide d'un solvant acétonitrile/ eau/ acide trifluoroacétique 80/20/0,1 (v/v/v). Le second dosage est celui des plipastatines ou fengycines. 20 µL d'échantillon purifié ou filtré sont injectés à un débit de 0,6 mL/min et confrontés à un standard externe de fengycine à 500 mg/L (fourni par le Dr. Magali Deleu). L'élution est réalisée grâce à un gradient d'un solvant acétonitrile/ eau/ acide trifluoroacétique de 45/55/0,1 jusqu'à 55/45/0,1 (v/v/v) pendant 30 min, puis en mode isocratique 55/45/0,1 (v/v/v) pendant 10 min. Le temps de rétention et la dérivée seconde du spectre entre 200 et 400 nm de chaque pic (barrette de diodes, PDA 2996, Waters) sont analysés automatiquement à l'aide du logiciel Millennium pour l'identification des molécules éluées.

#### 9.4.4. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince a surtout été utilisée pour vérifier la présence de lipopeptides dans certains échantillons en complément de l'analyse CLHP. 100 µL de chaque échantillon à analyser sont déposés à 1 cm du bord de la couche mince de silice. Le solvant de migration est un mélange de chloroforme/ méthanol/ eau 65/35/4 (v/v/v).

La migration a alors lieu par capillarité. Les composés migrent en fonction de leur hydrophobicité. Une tache hydrophobe apparaît après révélation à l'eau. La lecture est confirmée sous UV. Dans ces conditions de migration utilisées, la valeur du rapport frontal  $R_f$  est de 0,8 pour la surfactine.

#### 9.5. DOSAGE DU GLUCOSE, DU GLUTAMATE ET DES ACIDES ORGANIQUES PAR CLHP

Ce dosage se réalise par chromatographie liquide à haute performance Spectra SYSTEM P1000 XR Thermoelectron Corporation (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.), dans une colonne Fast fruit juice (co-polymère de sulfonate et styrène-divinylbenzène, 7  $\mu\text{m}$ , 7,8 x 150 mm, Waters). Une colonne de garde en co-polymère de sulfonate et de styrène-divinylbenzène (Grundy *et al.*, 1993) est placée en amont de la colonne. Les conditions opératoires sont les suivantes : le débit est fixé à 0,8 mL/min, la colonne est maintenue à 55°C grâce à un four pour colonne CLHP, l'éluant utilisé est une solution d' $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05%, le volume d'injection est de 20  $\mu\text{L}$ , la détection est réalisée à l'aide d'un réfractomètre Spectra SYSTEM RI-150 (Thermoelectron Corporation) et le temps d'une analyse est de 8 min. L'échantillon ne demande aucun prétraitement, à part une filtration à travers une membrane de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Chaque pic est identifié par son temps de rétention et les molécules sont quantifiées par rapport à une droite étalon préalablement réalisée à l'aide du logiciel AZUR 4.6 (AZUR software, Datalys, France).

#### 9.6. ANALYSE DES LIPOPEPTIDES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker Ultraflex tof, Bruker Daltonics) sont réalisées sur des solutions préparées à partir de surfactine et de fengycine lyophylisées et solubilisées dans du MeOH 100%. Le solvant TA est préparé en réalisant un mélange  $\text{CH}_3\text{CN}$ / eau/ acide trifluoroacétique, 33/67/0,1 (v/v/v). Le tampon CHCA est une solution saturée en acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dans du tampon TA. Il est préparé en récupérant le surnageant après centrifugation du mélange acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique / tampon TA. Les échantillons à analyser sont préparés en mélangeant 1  $\mu\text{L}$  de l'échantillon à 9  $\mu\text{L}$  de CHCA. La solution d'échantillon déposée pour l'analyse MALDI-TOF représente un volume de 0,5  $\mu\text{L}$ . Le séchage est réalisé à l'air libre. La calibration des masses est réalisée avec un mélange de peptides standards.

## 9.7. MESURE DU DEBIT STANDARD EN EAU DES MEMBRANES DE FILTRATION

Le débit standard en eau permet de déterminer l'intégrité des membranes et l'influence du colmatage réalisé par les cellules ou par les composés du milieu filtré. Cette mesure s'effectue avec de l'eau distillée à 25°C, celle-ci est filtrée à travers la membrane et le débit de filtrat est mesuré pour différentes pressions imposées sur le rétentat. Considérant pour ces pressions que la pression transmembranaire est constante.

9.8. ANALYSE DES GAZ ET MESURE DU  $K_{LA}$ 

Les gaz entrants et sortants sont analysés afin d'obtenir des données sur la respiration du microorganisme. Ces gaz sont tout d'abord séchés sur membrane Naflon (Permapur) afin d'éviter une erreur sur la mesure, due à la présence de vapeur d'eau. Un capteur paramagnétique permet l'analyse de l'oxygène et un capteur infrarouge celle du dioxyde de carbone (Xentra 4400, Servomex). L'analyseur s'intègre à un dispositif multiplexé qui permet une analyse séquentielle sur six voies et une calibration automatique. Ces analyses sont enregistrées en ligne et ces enregistrements vont permettre de calculer le taux de consommation d'oxygène (OUR) et le taux de production de dioxyde de carbone (CPR), ainsi que le quotient respiratoire, selon les équations ci-après.

Ces équations tiennent compte des conditions de pression et de température du système. De même une fois rapportés à la biomasse, ils nous permettront de déterminer l'OUR spécifique et le CPR spécifique.

Sachant qu'il y a conservation des gaz inertes entre la sortie et l'entrée d'un fermenteur, la relation entre les débits de gaz d'entrée et de sortie du fermenteur peut s'écrire :

$$F_e \times P_{ie} = F_s \times P_{is} \quad (4)$$

D'autre part :

$$P_{ie} + P_{O_{2e}} + P_{CO_{2e}} = 1$$

$$P_{is} + P_{O_{2s}} + P_{CO_{2s}} = 1$$

Le rapport des pressions partielles entrantes et sortantes peut être défini selon l'équation (5).

$$k = \frac{(1 - P_{O_{2e}} - P_{CO_{2e}})}{(1 - P_{O_{2s}} - P_{CO_{2s}})} = \frac{P_{ie}}{P_{is}} \quad (5)$$

En tenant compte des équations 4 et 5, l'OUR et le CPR peuvent être ainsi calculés

$$OUR = \frac{1000}{22,4} \times \frac{273}{273 + te} \times \frac{Pe}{Patm} \times \frac{Fe}{V} \times (P_{O_{2e}} - k \times P_{O_{2s}}) \quad (6)$$

$$CPR = \frac{1000}{22,4} \times \frac{273}{273 + te} \times \frac{Pe}{Patm} \times \frac{Fe}{V} \times (k \times P_{CO_{2s}} - P_{CO_{2e}}) \quad (7)$$

$$QR = \frac{CPR}{OUR} \quad (8)$$

A noter que l'équation 7 ne tient pas compte du CO<sub>2</sub> dissous et accumulé dans le fermenteur, mais à pH = 7,0 celui-ci sera considéré comme négligeable.

Pour chaque contacteur à membrane, le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (K<sub>L</sub>a) est mesuré dans les mêmes conditions que les procédés de fermentation, à l'exception du remplacement du milieu de Landy par l'eau distillée à pH 7. L'oxygène dissous est mesuré avec une sonde immergée Mettler Toledo. Les valeurs du K<sub>L</sub>a sont mesurées selon la méthode du dégazage à l'azote. Elle consiste à couper l'arrivée d'oxygène, puis à faire buller de l'azote jusqu'à l'obtention d'une valeur nulle d'oxygène dissous afin de pouvoir mesurer la remontée de la valeur d'oxygène dissous (Trible *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2006). La valeur initiale du K<sub>L</sub>a des membranes est déterminée pour chaque bioréacteur en faisant varier les conditions du débit de circulation et d'agitation.

Dans le cas d'une membrane immergée nous avons pu constater que l'agitation a un rôle non négligeable dans le transfert volumétrique d'oxygène. Son augmentation permet de réduire la couche limite d'air à la surface de la membrane. Une fois ces conditions déterminées, la valeur du K<sub>L</sub>a a été fixée proche de celle du bioréacteur aéré par bullage.

Pour la mesure du K<sub>L</sub>a pendant le processus de fermentation, la moyenne des valeurs du K<sub>L</sub>a a été estimée en utilisant l'équation (9), où l'OUR (pour Oxygen Uptake Rate) est calculé à partir des données acquises par le logiciel AFS Biocommand et de l'équation (6), C\* est la concentration de saturation de l'oxygène dans le milieu à 30°C (0,234 mol l<sup>-1</sup>) et C<sub>p</sub> la concentration dans le milieu à l'instant t, calculée à partir de la sonde à oxygène dissous.

$$K_{La} = \frac{1}{n_{values}} \times \sum \frac{OUR}{C^* - \left( \frac{C_p \times 0,234}{100} \right)} \quad (9)$$

## 10. TESTS D'ACTIVITES BIOLOGIQUES

### 10.1. ACTIVITE $\alpha$ -AMYLASE

La mesure de l'activité de l' $\alpha$ -amylase est très employée en biologie moléculaire, cette dernière est codée par le gène *amyE*. Il devient donc possible de vérifier l'insertion d'un gène à ce locus en observant la perte de l'activité de l'amylase, par exemple lors de l'insertion du gène *sfp* au locus *amyE*, (§ 4.1, page 81). Pour réaliser ce test le protocole est le suivant : la ou les souches sont déposées sur un milieu gélosé LB complétement d'amidon à 1%. Après 48 h, les boîtes sont immergées avec une solution d'iodure de potassium/iode. Un halo de clarification de l'amidon apparaît alors si le gène *amyE* est fonctionnel et que l'amylase est active.

### 10.2. ACTIVITE HEMOLYTIQUE

Le caractère amphiphile de la surfactine lui permet d'interférer avec les membranes biologiques (Arima *et al.*, 1968; Deleu *et al.*, 1999a). Ces propriétés lui permettent notamment de lyser les hématies. La production de surfactine peut être détectée sur un milieu gélosé complété de 5% de sang de cheval défibriné (AES Laboratoires, Bruz, France). La préparation des boîtes de Petri et de l'inoculum de *B. subtilis* s'effectue selon la méthode standardisée utilisée pour le test de colonisation (§ 10.3, page 117).

Les souches sont incubées à 37°C. Le suivi des boîtes s'effectue pendant 3 à 5 jours et le diamètre d'hémolyse est régulièrement mesuré. Le test est positif lorsqu'un halo translucide est visible à la périphérie de la colonie. L'expérience est réalisée en trois exemplaires pour chaque souche et chaque milieu.

### 10.3. CAPACITES DE COLONISATION

Les lipopeptides de *B. subtilis* et notamment la surfactine, possèdent des propriétés tensioactives capables de réduire la tension de surface du milieu dans lequel ils sont produits (Deleu *et al.*, 1999a; Shen *et al.*, 2009). La production de ceux-ci favorise la colonisation d'un milieu par la souche qui les produit.

Le test défini ci-dessous a été inspiré des travaux récents sur le swarming de *B. subtilis* (Julkowska *et al.*, 2004; Julkowska *et al.*, 2005; Leclère *et al.*, 2006; Hamze *et al.*, 2009) et amélioré pour assurer la reproductibilité des résultats. Il repose sur deux paramètres qui doivent être extrêmement contrôlés, à savoir l'état physiologique des cellules et l'état de séchage du milieu. Les boîtes sont préparées comme suit : pour chaque boîte, déposer 25 mL de milieu gélosé à 0,7% (B, LB, Landy MOPS, PDA, etc...), laisser prendre en masse pendant 90 min et sécher les boîtes 15 min sous flux laminaire avant l'ensemencement (Leclère *et al.*, 2006).

Les cellules sont préparées afin de les obtenir en phase exponentielle de croissance. Une colonie est reprise d'une culture fraîche sur LB et inoculée dans 5 mL de milieu (non gélosé) et la culture est incubée une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain une dilution de cette culture à  $DO_{600nm}=0,1$  est réalisée dans 5 mL de milieu et incubée à 37°C jusqu'à  $DO_{600nm}=0,4$  (environ 2 h). Une dilution est réalisée à  $DO_{600nm}=0,1$  et 2  $\mu$ L de cette dilution sont déposés au centre de la boîte. Le tout est alors séché jusqu'au séchage complet de la goutte au moins 15 min sous hotte à flux laminaire. Les boîtes sont incubées à 37°C et l'avancement de la colonisation est mesuré à différents temps. L'expérience est réalisée en trois exemplaires pour chaque souche et chaque milieu.

#### 10.4. ACTIVITES ANTIBACTERIENNES

Les tests antibactériens sont réalisés en doubles couches, c'est-à-dire qu'une première gélose de 20 mL (17 g d'agar /L) de LB est coulée dans une boîte de Petri. Après un séchage de 90 min, 5 mL de LB en surfusion (8 g d'agar/L), contenant 500  $\mu$ L d'une suspension diluée de bactéries, sont coulés sur cette même boîte, et le tout est séché 15 min sous hotte à flux laminaire. Des tests ont été effectués contre *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*. Après ces 15 min, 3  $\mu$ L de la souche à étudier sont déposés au centre de la boîte, puis un nouveau séchage sous hotte à flux laminaire est effectué. La boîte est ensuite incubée 48 h à 37°C. Un halo d'inhibition de croissance est alors éventuellement observé.

## 10.5. ACTIVITES ANTIFONGIQUES

Sur une boîte de Pétri contenant 20 mL de milieu PDA, à équidistance du centre de la boîte, sont placés 5  $\mu$ L de culture des souches à  $DO_{600} = 0,2$  et un petit carré de gélose contenant la moisissure, provenant d'une culture fraîche. La préparation des boîtes de milieu PDA et de l'inoculum des souches de *B. subtilis* est réalisée selon la méthode standardisée utilisée pour le test de colonisation. La moisissure de référence utilisée ici est *Fusarium oxysporum*.

# **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

## 1. MISE EN ŒUVRE D'UN BIOREACTEUR AERE PAR UN CONTACTEUR AIR/LIQUIDE A MEMBRANE

### 1.1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, les lipopeptides produits par *B. subtilis* présentent un fort potentiel d'applications biotechnologiques (§ 1.4.3, page 40). Un intérêt prononcé est en particulier porté sur leurs propriétés tensioactives. A l'échelle industrielle, les biosurfactants peuvent être produits en quantité en cultivant *B. subtilis* en bioréacteur agité en condition aérobie. Une difficulté majeure est liée aux propriétés moussantes de ces tensioactifs qui provoquent le débordement intempestif du milieu de culture (§ 1.5.3, page 43). Différentes techniques ont été utilisées soit pour limiter la formation de mousse, soit pour la favoriser et récupérer les lipopeptides dans la mousse. Cependant, ces techniques empêchent la mise en œuvre d'une extraction et d'une purification continue en aval de la fermentation. Dans la plupart des études récentes, la production de surfactine en bioréacteur est réalisée avec la souche *B. subtilis* ATCC 21332, considérée comme une souche modèle productrice d'une seule famille de lipopeptides, les surfactines.

Le but de notre étude consiste à élaborer une technique originale d'aération sans bulles de la cuve de fermentation afin de produire sans formation de mousse des lipopeptides avec *B. subtilis* ATCC 21332. Cette technique d'aération repose sur l'utilisation d'un contacteur air/liquide à membrane. Elle a été employée pour la culture de cellules eucaryotes, mais n'a jamais été utilisée pour la production de biosurfactants (§ 1.6.2.2, page 52). Dans ce chapitre, nous analyserons les performances de trois bioréacteurs utilisant une membrane en fibres creuses comme contacteur air/liquide qui seront comparés à un bioréacteur moussant aéré par injection d'air en fond de cuve, utilisé comme référence.

## 1.2. CULTURE BATCH DE *B. SUBTILIS* ATCC 21332 EN BIOREACTEUR AERE PAR UN CONTACTEUR AIR/LIQUIDE A MEMBRANE.

La souche de *B. subtilis* ATCC 21332 a été cultivée en batch dans du milieu de Landy à 30°C pendant 74 h et selon les conditions décrites précédemment (§ 6, page 94). Les résultats décrits dans ces travaux proviennent d'expériences réalisées en doubles exemplaires dans trois bioréacteurs aérés par un contacteur air/liquide à membrane (BB : bioréacteurs sans bulles), et ont été comparés à ceux d'un bioréacteur classique aéré par barbotage (BM : bioréacteur moussant).

Les caractéristiques des différents procédés de fermentation sont détaillées dans le Tableau 8, page 96, les représentations schématiques de ces bioréacteurs ont été présentées précédemment (§ 6.1, page 94). Le bioréacteur moussant est réalisé avec barbotage d'air par le fond de cuve (Fig. 26, page 94). Le bioréacteur sans bulles 1 (BB1) est couplé à un module externe en fibres creuses de polyéthersulfone utilisé comme un contacteur air/liquide (surface 2,5 m<sup>2</sup>, taille de pores 0,65 µm) et le bioréacteur sans bulles 2 (BB2) à un module externe en fibres creuses de polypropylène (surface 1,9 m<sup>2</sup> ; 0,2 µm) (Fig. 27, page 98). Une membrane immergée en fibre de polypropylène est utilisée dans le bioréacteur sans bulles 3 (BB3) (Fig. 28, page 99). La petite surface de celle-ci (0,375 m<sup>2</sup>) permet de l'immerger complètement dans le milieu. Une étude en milieu aqueux à 30°C a été menée à ce propos, selon la méthode du dégazage à l'azote (§ 9.8, page 115), pour identifier les paramètres influant sur le  $K_{La}$  de chacun des bioréacteurs sans bulles. Dans le cas des membranes externes, l'agitation du milieu de culture n'influe quasiment pas sur le  $K_{La}$ . Dans le cas de la membrane immergée, l'agitation influe sur le coefficient de transfert volumétrique en oxygène ( $K_{La}$ ), elle a été fixée à 500 tr/min pour obtenir un  $K_{La}$  initial proche de ceux du bioréacteur moussant (BM) et du BB1. En revanche, le  $K_{La}$  de la membrane externe en polypropylène (MEDOS) n'a pu être augmenté au-dessus de 9 h<sup>-1</sup>. Ce faible transfert d'oxygène est lié directement à la configuration de cette membrane.

Les paramètres suivants ont été suivis au cours de la culture : croissance de la biomasse, concentration en lipopeptides dans le bouillon de culture, production totale de lipopeptides, taux de consommation de l'oxygène (OUR, pour l'abréviation anglophone d'Oxygen Uptake Rate), taux de production de dioxyde de carbone (CPR, pour l'abréviation anglophone de Carbon dioxide Production Rate), concentration en oxygène dissous et consommation d'acide ou de base nécessaire à la régulation du pH. Ensuite, le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_L a$ ) a été mesuré avant, pendant et après les cultures. Par ailleurs afin de pouvoir comparer aisément les résultats des BB à ceux du BM, les différentes productions sont exprimées en quantité.

### 1.2.1. Croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en milieu de Landy

Dans tous les bioréacteurs, le profil caractéristique d'une culture batch de *B. subtilis* ATCC 21332 en bioréacteur est observé (Fig. 33, page 123). Il commence par une phase de croissance exponentielle durant les 6 premières heures de culture, comme indiqué sur la courbe de diminution de l'oxygène dissous (Fig. 34, page 125). La croissance devient ensuite une fonction linéaire du temps dans les bioréacteurs BM, BB1 et BB2 (Fig. 33, page 123).

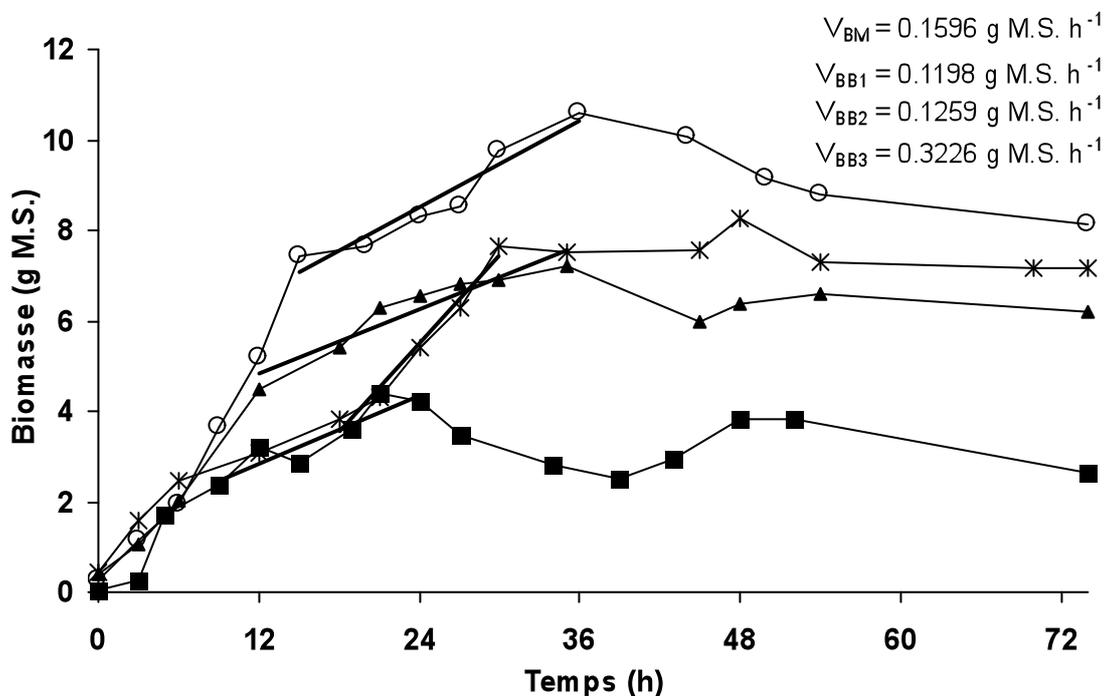


Fig. 33 Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 durant une culture batch en milieu de Landy à 30°C, le pH est maintenu à 7. Le volume de culture des BM, BB1 et BB2 est de 3 L, celui du BB3 de 2,5 L. La vitesse mentionnée en haut à droite correspond aux vitesses de croissance durant la phase linéaire. O Bioréacteur Moussant (BM); ▲ Bioréacteur sans bulles 1 ■ Bioréacteur sans bulles 2; ★ Bioréacteur sans bulles 3.

Durant cette phase, dans le BM la biomasse augmente linéairement avec une vitesse de croissance de 0,159 g M.S./h, jusqu'à atteindre une quantité maximale de 10,6 g de M.S. après 36 h de culture (Tableau 9, page 124 et Fig. 33, page 123). La formation de mousse commence dès la 6<sup>ème</sup> heure, ce qui conduit au débordement du fermenteur, la mousse est alors collectée dans des surverses. La biomasse extraite du bioréacteur dans les 1,13 L de mousse collectée est de 1,4 g de M.S., ce qui donne une biomasse totale de 12 g M.S., soit un rendement de conversion du glucose en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,21 g M.S./g en fin de culture.

Dans le BB1, la biomasse augmente linéairement entre 12 et 36 h de culture, avec une vitesse de croissance de 0,119 g M.S./h. Une quantité maximale de biomasse en suspension de 7,2 g M.S. est atteinte après 36 h de culture (Fig. 33, page 123). Une partie de la biomasse est fixée sur les fibres du contacteur et est décrochée par lavage. La quantité de la biomasse adhérente récupérée après le lavage de la membrane est de 2,1 g M.S., ce qui donne une production de biomasse totale de 9,3 g M.S. avec un  $Y_{X/S}$  de 0,16 g M.S./g (Tableau 9, page 124).

Tableau 9 Valeurs caractéristiques de la production de biomasse dans les différents procédés de fermentation batch<sup>1</sup>

Analyses	Bioréacteur	Bioréacteur	Bioréacteur	Bioréacteur
	Moussant (BM)	sans bulles 1 (BB1)	sans bulles 2 (BB2)	sans bulles 3 (BB3)
Vitesse de croissance de la phase linéaire (g M.S./h)	0,159	0,119	0,125	0,322
Quantité maximale de biomasse en suspension (g M.S.)	10,6	7,2	4,4	8,2
Biomasse extraite dans la mousse (g M.S.)	1,4	-	-	-
Biomasse désorbée de la membrane* (g M.S.)	-	2,1	1,2	0,3
Biomasse totale produite (g.M.S.)	12	9,3	5,6	8,5
$Y_{X/S}$ (g M.S./g)	0,21	0,16	0,1	0,21

<sup>1</sup> Toutes les valeurs sont des moyennes provenant de 2 expériences (La déviation standard est essentiellement comprise entre 1 et 12%). Le volume de fermentation est de 3 L pour le BM, BB1 (membrane externe en PES, 2,5 m<sup>2</sup>, 0,65 µm), BB2 (membrane externe en PP, 1,9 m<sup>2</sup>, 0,2 µm); et de 2,5 L pour le BB3 (membrane immergée en PP, 0,375 m<sup>2</sup>, 0,05 µm) comme décrit dans le Tableau 8, page 96.

★ Après deux lavages avec de l'eau distillée à 30°C et deux lavages avec NaOH 0,1 M pH 10,0 à 50°C, comme décrit § 6.2.3, page 99.

Dans le BB2, la croissance est linéaire de la 9<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> heure de culture avec une vitesse de croissance de 0,125 g M.S./h. Après la 24<sup>ème</sup> heure, la croissance bactérienne du BB2 s'arrête. La quantité maximale de la biomasse en suspension (4,4 g DW) est atteinte après la 18<sup>ème</sup> heure de culture (Tableau 11, Fig. 33, page 123). La quantité de la biomasse adhérente mesurée après le lavage de la membrane est de 1,2 g M.S., ce qui donne une croissance globale de 5,6 g M.S. et un  $Y_{X/S}$  de 0,1 g M.S./g (Tableau 9, page 124).

Dans le cas du BB3, la croissance semble présenter une diauxie avec un ralentissement notable de la croissance, faisant suite à la phase exponentielle de croissance, entre la 9<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> heure de culture. Puis la biomasse augmente linéairement entre les 18<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> heures de culture, avec un taux de croissance de 0,326 g M.S./h (Fig. 33, page 123). Une quantité maximale de biomasse en suspension de 8,2 g de M.S. est atteinte après la 30<sup>ème</sup> heure de culture. Après le lavage de la membrane, la quantité récupérée de biomasse est de 0,3 g, ce qui représente une croissance globale de 8,5 g M.S., donnant un  $Y_{X/S}$  de 0,24 g M.S./g (Tableau 9, page 124).

La représentation logarithmique de la chute de l'oxygène dissous au cours de la croissance exponentielle est montrée sur la Fig. 34. La valeur d'oxygène dissous chute à 0%, entre 3 et 6 h de culture en fonction de la phase de latence de la culture, à une vitesse similaire pour le BM, le BB2 et le BB3, celle-ci étant plus élevée pour le BB1.

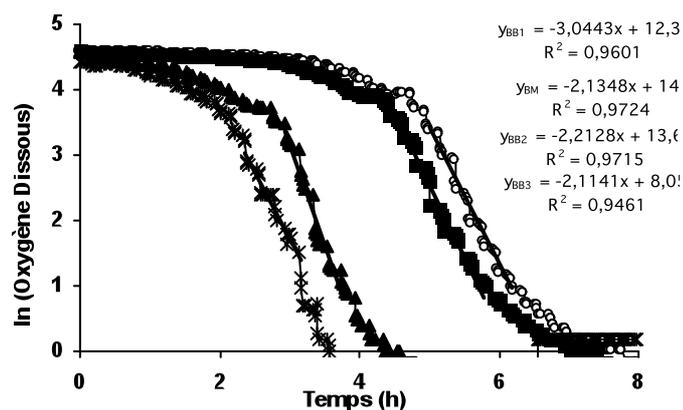


Fig. 34 Représentation logarithmique de la chute de l'oxygène dissous durant les 8 premières heures de la culture batch de *B. subtilis* ATCC 21332. Les données acquises grâce à une sonde Mettler Toledo, sont enregistrées et traitées par le logiciel AFS Biocommand Interface. Les équations mentionnées en haut à droite correspondent à la chute exponentielle de l'oxygène dissous dans chacun des bioréacteurs sans bulles ○ Bioréacteur Moussant; ▲ Bioréacteur sans bulles 1 ■ Bioréacteur sans bulles 2; ★ Bioréacteur sans bulles 3

### 1.2.2. Production de lipopeptides

Le dosage des lipopeptides est réalisé par CLHP selon les conditions décrites précédemment (§ 9.4.3, page 113 et Fig. 35, page 126). Les lipopeptides sont extraits en continu par la formation de mousse dans le bioréacteur moussant. Il en résulte des concentrations de surfactine proches de la CMC dans le bouillon de culture pendant toute la durée de la culture (17 mg/L).

L'analyse de la mousse a révélé que la surfactine est produite à partir de la fin de la phase exponentielle, jusqu'à la 54<sup>ème</sup> heure de la phase stationnaire. Après 72 h de culture, la quantité de surfactine produite, calculée à partir de la mousse et de l'analyse du bouillon de culture est de 774 mg. Le rendement de conversion du glucose en surfactine ( $Y_{P/S}$ ) est de 13,5 mg/g.

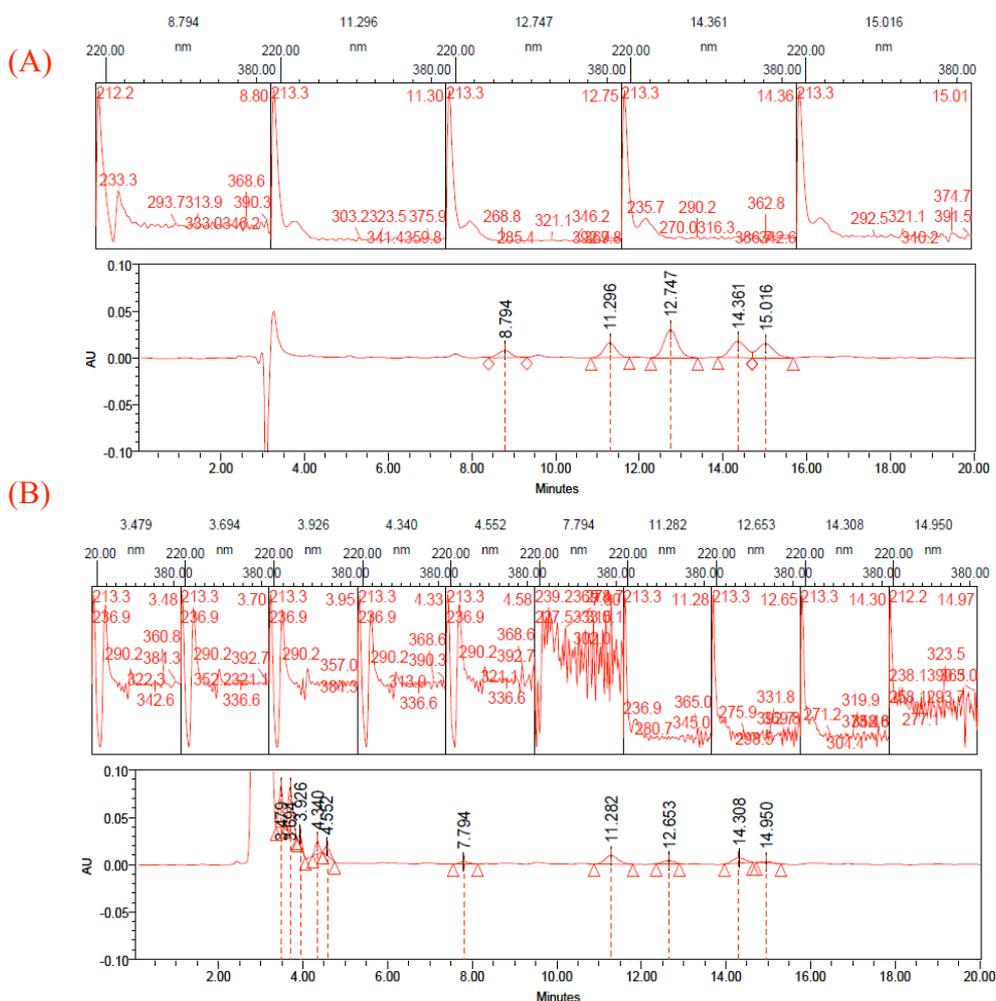


Fig. 35 Chromatogramme CLHP de la surfactine et quantification par la méthode du standard externe. La dérivée seconde de chaque pic intégré est présentée au dessus du chromatogramme. Chromatogramme (A) : standard de surfactine à 500 mg/L ; Chromatogramme (B) : échantillon dilué de BB3 après 73 h de culture.

Dans aucun des bioréacteurs sans bulles, de la mousse ne se forme. Cependant, les quantités de surfactine récupérées dans les milieux de culture du BB1, du BB2 et du BB3 sont respectivement de 168, 543 et 319 mg (Tableau 10, page 127). Le lavage des membranes utilisées dans ces bioréacteurs sans bulles révèle qu'une partie de la surfactine s'est adsorbée sur ces membranes. En conséquence, la cinétique de la production de la surfactine n'est pas significative tant que la membrane n'est pas saturée, elle n'est donc pas présentée.

Tableau 10 Production de lipopeptides pour les différents procédés de fermentation de type batch<sup>1</sup>

Analyses	Bioréacteur Moussant	Bioréacteur sans bulles 1 (BB1)	Bioréacteur sans bulles 2 (BB2)	Bioréacteur sans bulles 3 (BB3)
<b>Analyse de la production de surfactine</b>				
Quantité produite dans le milieu : mg	60	168	543	319
Quantité extraite dans la mousse :mg	714	-	-	-
Quantité désorbée lors du lavage de la membrane* :mg	-	604	130	150
Quantité totale produite :mg	774	772	673	469
$Y_{P/S}$ (mg/g)	13,5	13,8	11,7	11,7
<b>Analyse de la production de fengycine</b>				
Quantité produite dans le milieu :mg	-	35	549	982
Quantité extraite dans la mousse :mg	45	-	-	-
Quantité désorbée lors du lavage de la membrane* :mg	-	112	66	0
Quantité totale produite :mg	45	147	615	982
$Y_{P/S}$ (mg/g)	0,78	2,6	10,7	24,6
<b>Production totale de lipopeptides</b>				
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,0136	0,0147	0,0214	0,0290
$Y_{P/X}$ (g/g de M.S.)	0,066	0,095	0,214	0,148

<sup>1</sup> Toutes les valeurs sont des moyennes provenant de 2 expériences (La déviation standard est essentiellement comprise entre 1 et 12%). Le volume de fermentation est de 3 L pour le BM, BB1 (membrane externe en PES, 2,5 m<sup>2</sup>, 0,65 μm), BB2 (membrane externe en PP, 1,9 m<sup>2</sup>, 0,2 μm); et de 2,5 L pour le BB3 (membrane immergée en PP, 0,375 m<sup>2</sup>, 0,05 μm) comme décrit dans le Tableau 8, page 96.

★ Après deux lavages avec de l'eau distillée à 30°C et deux lavages avec NaOH 0,1 M pH 10.0 à 50°C, comme décrit § 6.2.3, page 99.

Le lavage des membranes utilisées dans le BB1, BB2 et BB3 permet de désorber respectivement 604, 130 et 150 mg de surfactine, ce qui donne des quantités totales de surfactine produites respectives de 772, 673 et 469 mg.

Ces résultats permettent d'obtenir des  $Y_{P/S}$  de 13,8 mg/g pour le BB1, 11,7 mg/g pour le BB2 et le BB3, ce qui est très proche de la valeur obtenue avec le BM (13,5 mg/g).

Lors de l'analyse CLHP des surnageants de culture pour la quantification de la surfactine, un groupe de pics possédant une dérivée seconde proche de celle de la fengycine a été observé juste après le pic d'injection, (Fig. 35, page 126). Ceci a donc donné lieu à une analyse par CLHP de la présence de fengycine. Cette analyse a révélé des quantités de fengycine produite non négligeables (Fig. 36, page 128).

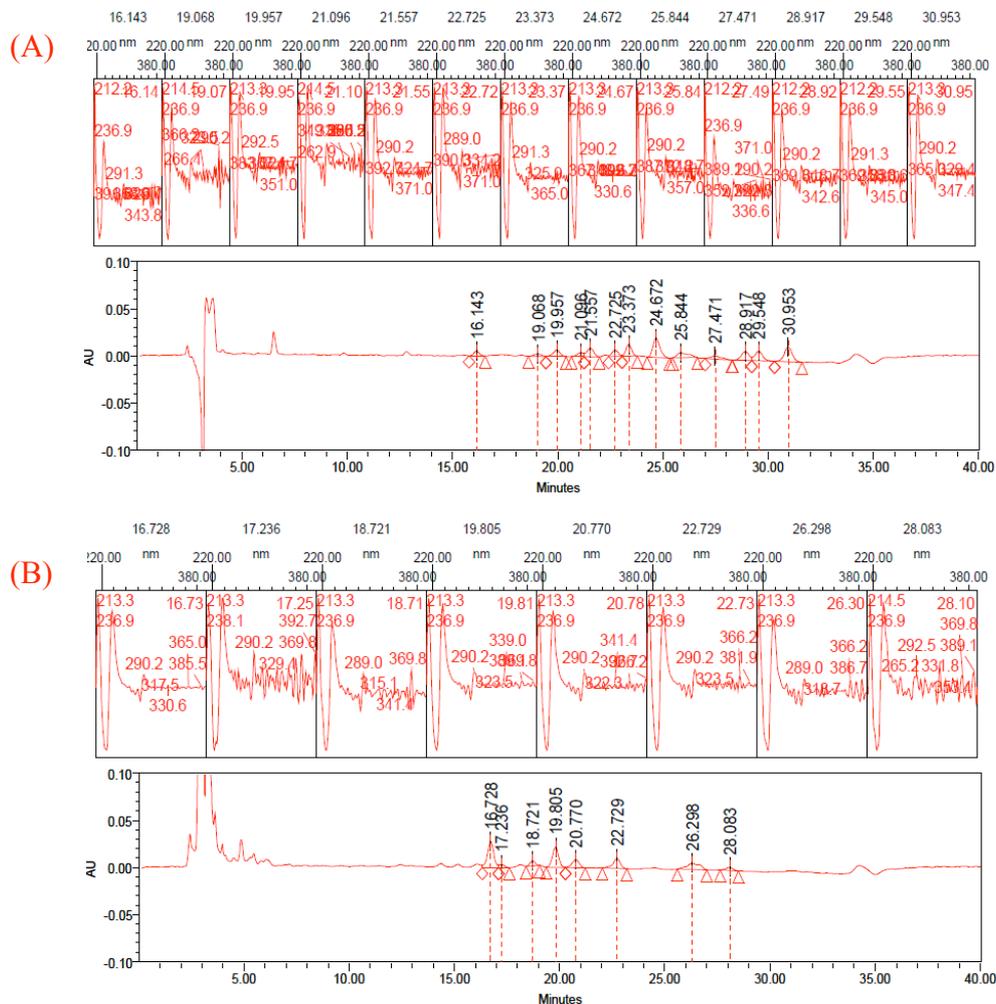


Fig. 36 Chromatogramme CLHP de la fengycine et quantification par la méthode du standard externe. La dérivée seconde de chaque pic intégré est présentée au dessus du chromatogramme. Chromatogramme (A) : standard de fengycine à 250 mg/L ; Chromatogramme (B) : échantillon dilué du BB3 après 73 h de culture.

Dans le BM, la production de fengycine commence après la 24<sup>ème</sup> heure et jusqu'à la fin de la culture (Fig. 37, page 129), et celle de la fengycine est de 45 mg (Tableau 10, page 127). Les quantités de surfactine et de fengycine produites par quantité de glucose introduite ( $Y_{P/S}$ ) sont respectivement de 13,5 et 13,8 mg/g de glucose consommé. La production de fengycine des bioréacteurs à membrane commence dès la 12<sup>ème</sup> heure de la culture et augmente rapidement au cours de la phase de croissance linéaire (Fig. 37, page 129).

Dans le BB1, cette production reste relativement faible (35 mg), mais atteint 549 mg dans le BB2 et 982 mg dans le BB3. Seule une petite quantité de fengycine est désorbée durant les étapes de lavage des membranes, ce qui montre que la fengycine s'adsorbe peu aux membranes dans les conditions de production.

Les quantités de fengycine désorbées de la membrane de la BB1 et de la BB2 sont de 112 et 66 mg, ce qui donne des  $Y_{P/S}$  de 2,62 mg/g et 10,7 mg/g pour la fengycine produite respectivement dans le BB1 et le BB2. Aucune fengycine n'a été désorbée de la membrane du BB3, mais la quantité de fengycine produite dans le milieu de culture de ce bioréacteur sans bulles 3 atteint une valeur sensiblement plus élevée que celle obtenue pour les autres bioréacteurs sans bulles, avec un maximum de 982 mg et un  $Y_{P/S}$  de 24,6 mg/g (Tableau 10, page 127). De même qu'une vitesse de production de 39,9 mg/h peut être observée pendant la croissance dans ce bioréacteur, soit plus de 10 fois que celle obtenue dans de bioréacteur moussant (Fig. 37, page 129).

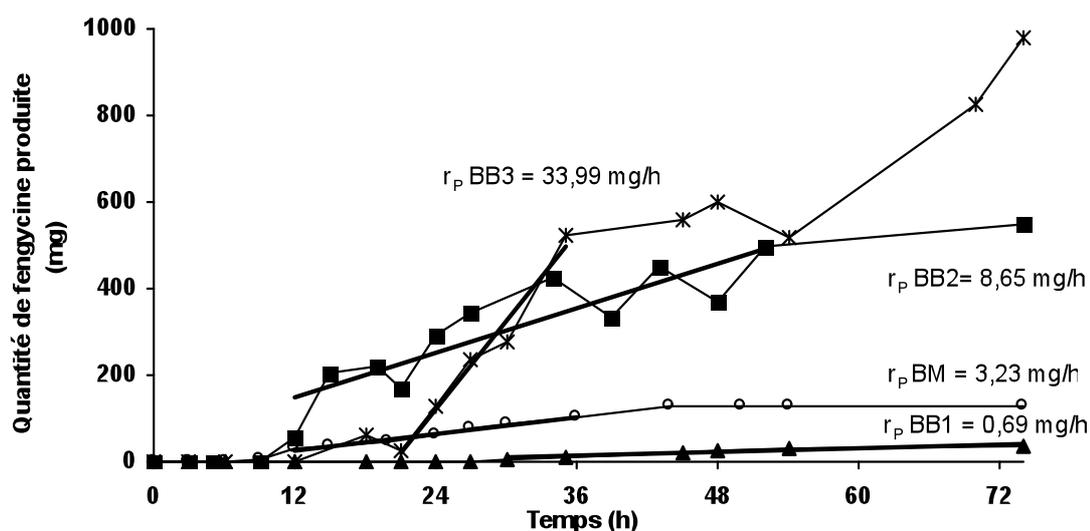


Fig. 37 Analyse de la quantité de fengycine produite dans le milieu de culture ou dans la mousse durant la culture en batch de *B. subtilis* ATCC 21332. Les volumes de milieu de culture pour les BB1, BB2 et BB3 sont de 3 L et 2,5 L pour le BB3. ○ Bioréacteur Moussant (BM); ▲ Bioréacteur sans bulles 1 (BB1); ■ Bioréacteur sans bulles 2 (BB2); ★ Bioréacteur sans bulles 3 (BB3).

1.2.3. Données physiologiques de la culture

Pendant la première phase de culture, jusqu'à la 12<sup>ème</sup> heure de culture, les différentes cultures présentent un profil similaire de consommation de NaOH avec un maximum de 30 mM ajouté à 12 h culture dans le cas du BB3 (Fig. 38, page 130). Ce phénomène résulte le plus souvent d'une limitation en oxygène (§ 1.3, page 25). Ensuite, un ajout d'acide est observé jusqu'à la fin de la culture (Fig. 38, page 130). Néanmoins, cette période d'alcalinisation du milieu dans le bioréacteur moussant (BM) est entrecoupée d'une période de consommation de soude que l'on ne retrouve pas pour les bioréacteurs sans bulles. Ceci pourrait être le simple résultat d'une difficulté à réguler le pH à cause de la présence de mousse. En revanche un pic d'acidification est observé à la fin de la culture dans le BB3, pic correspondant à une forte production de fengycine dans le milieu (Fig. 37, page 129).

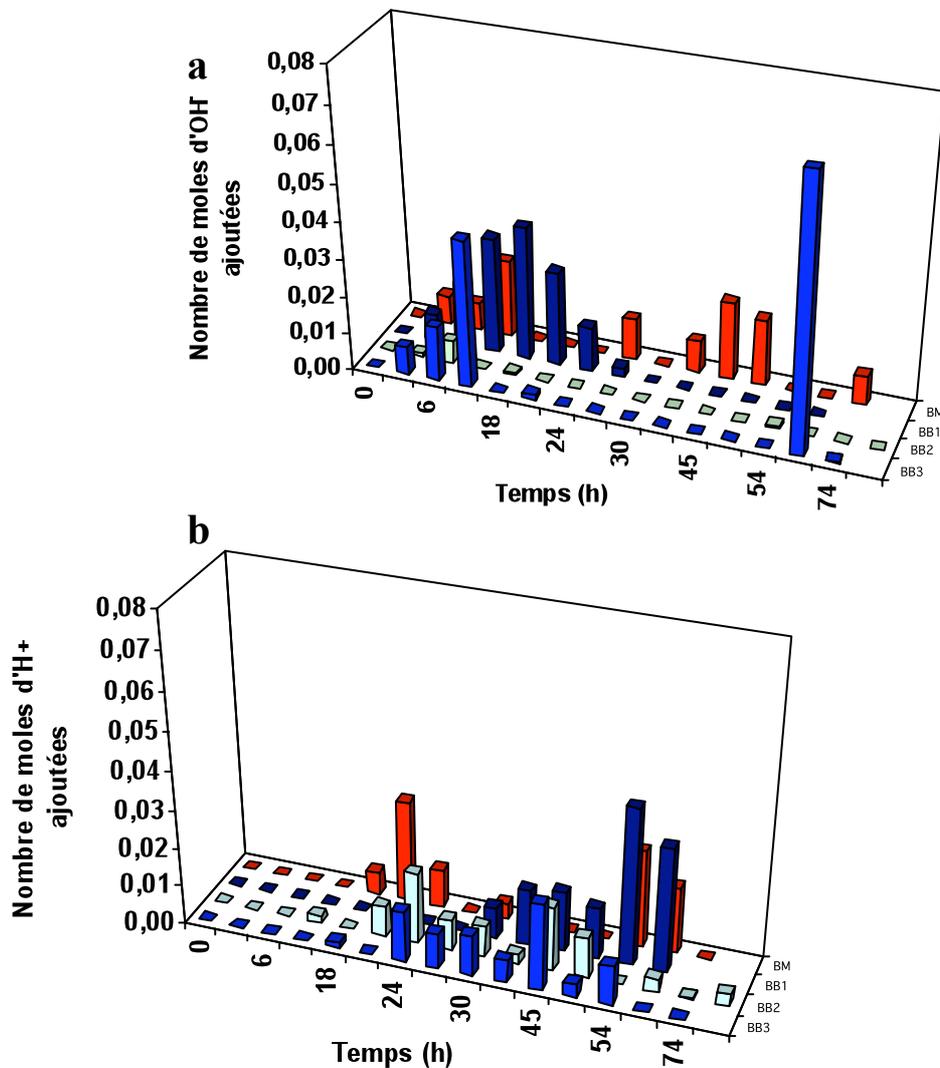


Fig. 38 Profil d'ajouts de base (a) ou d'acide (b) nécessaires pour maintenir le pH à 7,0, au cours de la fermentation. Les titrants ajoutés sont une solution de NaOH 3M et de l'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,66 M.

Les taux de consommation spécifique d'oxygène OUR et de production spécifique de dioxyde de carbone (CPR) des différents procédés sont calculés grâce aux équations (6) et (7), page 115. Ils sont à leur maximum au cours de la phase exponentielle, avec des valeurs respectives de 12 et 7 mmole/h/g M.S. dans le BM, 11 et 6 mmole/h/g M.S. dans le BB1, 17 et 15,5 mmole/h/g M.S. dans le BB2 et 4 et 2 mmole/h/g M.S. dans le BB3. Le décalage entre l'OUR et le CPR peut être dû à l'accumulation du CO<sub>2</sub> dans le milieu de culture. A la fin de cette phase, les valeurs des OUR et des CPR chutent à 2 mmole/h/g M.S. dans le BM, 3 mmole/h/g M.S. dans le BB1 et le BB2 et 1 mmole/h/g M.S. dans le BB3. Les quotients respiratoires (QR), calculés à partir de l'équation (8) (page 115), se stabilisent à 1 à partir de la 12<sup>ème</sup> et jusqu'à la 50<sup>ème</sup> heure de la culture dans le FB et le BB1, ce qui correspond à une respiration classique du glucose. Dans le BB3, ce paramètre reste à une valeur proche de 1 de la 18<sup>ème</sup> à la 70<sup>ème</sup> heure de la culture. Dans le BB2, la valeur du QR observée est assez variable, ne restant à 1 que durant une courte période de la culture précédant la 24<sup>ème</sup> heure.

#### 1.2.4. Etude de l'évolution du coefficient de transfert d'oxygène

La moyenne du K<sub>La</sub> au cours de la culture est calculée comme décrit précédemment grâce à l'équation 9, page 116. Le K<sub>La</sub> reste relativement stable au cours des cultures dans le BM et le BB1. Le K<sub>La</sub> moyen est respectivement de 23 h<sup>-1</sup> et de 22 h<sup>-1</sup>, comme le montre le tableau 11.

Tableau 11 Evolution du coefficient de transfert d'oxygène durant la fermentation<sup>1</sup>

	<b>Bioréacteur Moussant</b>	<b>Bioréacteur Sans bulles 1</b>	<b>Bioréacteur Sans bulles 2</b>	<b>Bioréacteur Sans bulles 3</b>
<i>K<sub>La</sub> initial (h<sup>-1</sup>)</i>	27,3 (SD : 0,2)	39,3 (SD : 0,1)	8,9 (SD : 0,1)	28,2 (SD : 0,1)
<i>K<sub>La</sub> moyen durant la fermentation (h<sup>-1</sup>)</i>	23,7 (SD : 9,8)	22,2 (SD : 4,5)	8,3 (SD : 3,2)	13,2 (SD : 3,5)
<i>K<sub>La</sub> après la fermentation (h<sup>-1</sup>)</i>	-	4,07 (SD : 0,01)	0,91 (SD : 0,01)	1,75 (SD : 0,06)
<i>K<sub>La</sub> après lavage* (h<sup>-1</sup>)</i>	-	15,4 (SD : 0,1)	8,9 (SD : 0,1)	4,4 (SD : 0,5)

★ Après deux lavages à l'eau à 30°C et deux lavages avec la solution de NaOH 0.1 M pH 10.0 à 50°C, comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes », § 6.2.3, page 99.  
SD: Deviation standard.

Après la 48<sup>ème</sup> heure de culture, le  $K_{L}a$  des bioréacteurs sans bulles commence à s'éroder. Ainsi la valeur mesurée après la fin de la fermentation dans le BB1, est de  $4,1 \text{ h}^{-1}$  (Tableau 11, page 131) ; cette diminution résulte de la croissance des cellules à l'intérieur des fibres creuses ou de l'adsorption de la surfactine. Plusieurs lavages à l'eau pH 7,0 à 30°C et avec la solution de NaOH 0,1 M pH 10 à 50°C permettent de restaurer partiellement le coefficient de transfert d'oxygène à une valeur de  $15,4 \text{ h}^{-1}$ . La valeur du  $K_{L}a$  pendant la fermentation dans le BB2 diminue après la 24<sup>ème</sup> heure de fermentation, passant de  $8,3 \text{ h}^{-1}$  à moins de  $0,9 \text{ h}^{-1}$  à la fin de culture. Le lavage de la membrane permet de restaurer quasiment le  $K_{L}a$  initial de la membrane. Dans le BB3, le calcul du  $K_{L}a$  montre qu'il reste stable à une valeur de  $13,2 \text{ h}^{-1}$  puisqu'il diminue après la 48<sup>ème</sup> heure de la culture pour atteindre une valeur de  $1,75 \text{ h}^{-1}$  à la fin de la culture. Dans ce cas, les lavages par l'eau à 30°C et la solution de NaOH 0,1 M n'ont pas permis de restaurer la valeur initiale du  $K_{L}a$ .

### 1.3. DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous avons proposé un concept original de bioréacteur sans bulles (Bubbleless Bioreactor) utilisant un contacteur air/liquide à membrane pour résoudre le problème de la formation de mousse résultant du barbotage de l'air et de la formation de bulles. Cette application du contacteur air/liquide à membrane n'a jamais été testée pour la production de biosurfactant. La membrane du contacteur offre une grande surface de contact avec le milieu de culture, ce qui permet le transfert d'oxygène dans le bouillon de culture sans la formation de bulles.

Nous avons démontré que les bioréacteurs sans bulles permettent la croissance des bactéries et la production de lipopeptides. Les taux de croissance à un stade précoce de la culture (six premières heures) sont similaires dans les quatre procédés mis en oeuvre (BM, BB1, BB2 et BB3). L'étude du comportement physiologique de la biomasse dans les bioréacteurs sans bulles reste cependant complexe à analyser comme en témoignent les différentes mesures indirectes de la physiologie cellulaire réalisées ici. Les cellules se trouvent en effet soit sous forme planctoniques dans le milieu de culture, soit sous forme immobilisées sur la membrane. Cette immobilisation étant plus que probablement influencée par la nature et la quantité de lipopeptide produite. Les biomasses totales obtenues sont du même ordre de grandeur avec toutefois une quantité plus faible pour le bioréacteur BB2.

A la fin des cultures, les rendements de conversion du glucose en biomasse sont d'ailleurs comparables à ceux trouvés dans d'autres études de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch à 30°C, que ce soit dans du milieu de Landy, de Cooper ou MSI (Davis *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2006). Néanmoins, l'évolution des facteurs tels que la consommation d'acide et de base ou le quotient respiratoire démontre des différences notables entre les 4 bioréacteurs. Le bioréacteur BB3 semble se différencier le plus des autres avec une biomasse adhérente sur la membrane plus faible, un phénomène de diauxie témoin d'un changement métabolique qui se traduit également par la production d'O<sub>2</sub> et la production de CO<sub>2</sub> plus faible et par un profil de contrôle du pH différent.

Aucune formation de mousse n'a été observée dans les bioréacteurs sans bulles malgré l'importante production de lipopeptides. Les quantités totales de lipopeptides produits dans les bioréacteurs sans bulles sont plus élevées que celles produites avec notre référence, le bioréacteur moussant (BM). Les rendements de production de surfactine sont similaires dans le BB1 et le BB2 comparés au BM, comme l'indique le  $Y_{P/S}$  (c'est-à-dire, à une valeur moyenne de 13 mg/g). Les rendements de production de surfactine calculés pour le BB1 et le BB2 sont supérieurs à ceux publiés dans de précédents travaux (Davis *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2001; Isa *et al.*, 2007), une plus faible production de surfactine dans le BB3 est également observée, mais la quantité totale de lipopeptides produits est plus élevée dans ce dernier (BB3), de même que les rendements de conversion du glucose en produit ( $Y_{P/S}$ ).

La production de fengycine obtenue dans le BB3, en plus de la production de surfactine, atteint un maximum de 982 mg après 72 h de culture, ce qui constitue un résultat impressionnant. Ce résultat est d'autant plus intéressant que la souche *B. subtilis* ATCC21332 à longterm a été considérée comme une souche ne produisant que la surfactine. Par ailleurs, il n'existe pas de valeur comparable de production de fengycine publiée dans la littérature avec d'autres souches. Le niveau élevé de production de fengycine pourrait expliquer la limitation de la production de surfactine dans le BB3 par une concurrence entre les deux voies métaboliques. Une bonne production de fengycine est également observée dans le BB2. L'amélioration de la production de fengycine semble être liée à la composition de la membrane et/ou à la réduction du transfert d'oxygène à travers celle-ci. Le contact entre les cellules de *B. subtilis* ATCC 21332 et des fibres creuses en PP peut également être à l'origine de la production de fengycine. D'autres expériences au laboratoire ont également montré un effet similaire du PP sur la production de fengycine par cette souche (Gancel *et al.*, 2009).

Les différents lavages montrent que la grande surface de la membrane semble favoriser une adsorption importante de surfactine à l'interface air-liquide de la membrane et également à l'intérieur des pores. Une grande partie de la surfactine s'adsorbe sur la membrane en fibres creuses, avec des différences de quantités fixées en fonction du type de membrane utilisée. Ce phénomène est particulièrement important avec les membranes de grande taille comme la membrane en fibres creuses de PES de 2,5 m<sup>2</sup>, sur laquelle 80% de la production de surfactine est adsorbée. La surfactine semble s'adsorber sur la membrane jusqu'à ce que la saturation de celle-ci soit atteinte, ce qui explique que dans le milieu de culture la surfactine reste sous sa CMC au début de la croissance. Puis, après plusieurs heures de culture, une fois la saturation de la membrane achevée, la surfactine s'accumule dans le milieu de culture.

La fengycine est faiblement adsorbée sur les membranes et notamment sur la membrane utilisée dans le BB3. La fengycine ne semble pas interagir avec les membranes, contrairement à la surfactine qui possède une forte affinité pour les membranes. La faible adsorption de la fengycine pourrait s'expliquer par une concurrence entre la surfactine et la fengycine pour l'adsorption sur le support. Premièrement, la surfactine est produite plus tôt que la fengycine. Deuxièmement, la surfactine a une vitesse d'adsorption plus élevée que la fengycine, comme cela a été précédemment prouvé à l'interface dodécane/eau (Deleu *et al.*, 1999b).

Le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_La$ ) est souvent utilisé comme un paramètre fondamental pour la conception et la montée en échelle d'un bioprocédé. Sa valeur optimale et les facteurs qui le limitent doivent donc être déterminés. L'adhésion de la biomasse sur les différentes fibres creuses rapportée à la surface de la membrane est assez similaire dans les différents bioréacteurs sans bulles. Cette forte adhésion limite le transfert d'oxygène à travers la membrane, en particulier dans le cas de la membrane en polyéthèresulfone où la taille des pores est importante. Initialement, les valeurs du  $K_La$  du BB1 et du BB3 sont équivalents à celui du BM, mais rapidement celui-ci diminue dans les bioréacteurs sans bulles. Cet effet est particulièrement important dans le BB3 (Tableau 11, page 131).

L'adsorption de la surfactine pourrait en être responsable en modifiant les caractéristiques de la membrane, une étude récente indique d'ailleurs que les lipopeptides ont un rôle important dans l'adhésion à diverses surfaces par interactions hydrophobes.

Après contact avec une surface, les lipopeptides peuvent former un film de conditionnement et faire varier ainsi les propriétés de surface comme l'hydrophobicité (Shakerifard *et al.*, 2009). Une étude plus approfondie sur l'adsorption de la surfactine devra donc être menée sur ces membranes en l'absence de cellules.

Ces différents bioréacteurs sans bulles couplés à des contacteurs air/liquide à membrane semblent faciliter la production sans mousse de lipopeptides et la croissance de la souche. A l'inverse avec le bioréacteur moussant, la mousse cause l'extraction des lipopeptides et de la biomasse, d'où une diminution du volume du milieu de culture, ce qui rend difficile le contrôle du procédé et impossible l'extraction des lipopeptides du milieu de culture. La réussite de ces nouveaux procédés d'aération permet d'envisager la production, l'extraction et la purification en continu de ces biosurfactants.

Il ressort de cette étude que le bioréacteur avec la membrane immergée en fibres creuses de polypropylène (BB3), conçu dans ce travail, semble apporter un grand avantage pour la production de fengycine. Grâce à ces travaux, nous pouvons suggérer que la membrane immergée en fibres creuses de porosité 0,2  $\mu\text{m}$  semble représenter une configuration idéale pour la croissance de *B. subtilis* et la production de fengycine sans formation de mousse. Néanmoins, la membrane en fibres creuses de polyéthersulfone serait plus appropriée pour la production de surfactine de par la plus faible capacité d'adsorption de celle-ci. En outre, une étude plus approfondie des paramètres cinétiques de l'adsorption de la surfactine sur les membranes doit être réalisée pour comprendre l'influence de la nature de la membrane, de l'environnement et de la taille des pores sur cette adsorption.

#### 1.4. VALORISATION DES RESULTATS

Ces travaux sur la mise en œuvre d'un bioréacteur à membrane pour la production de lipopeptides par *B. subtilis* ont permis de trouver une solution fiable au problème de mousse et permettent d'envisager la production, l'extraction et la purification des lipopeptides dans un procédé continu.

Ils ont donné lieu à la soumission d'un article dans *Applied Microbiology and Biotechnology* et cinq communications affichées ainsi que trois communications orales dans des congrès nationaux et internationaux (l'orateur est souligné). Toutes ces communications ayant été soumises à un comité de lecture.

#### 1.4.1. Publication

**Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2009).** Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. **Article soumis le 4 Juin 2009 à « Applied Microbiology and Biotechnology ».**

#### 1.4.2. Communications affichées

**Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2007).** Production of surfactin by *Bacillus subtilis* using a membrane bioreactor. BioMicroWorld 2007, Séville (Espagne); 28 Nov – 1 Dec.

**Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2008).** Production de lipopeptides par *Bacillus subtilis* dans un bioréacteur à membranes sans bulles. CNR IUT. Lyon-Villeurbanne, 29-30 Mai.

**Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2008)** Production of lipopeptides by *Bacillus subtilis* using a bubbleless membrane bioreactor. 7<sup>th</sup> European Symposium of Biotechnology and Engineering Science, Faro (Portugal), 7-10 Sept.

**Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2009)** Bubbleless membrane bioreactor for biosurfactant production. 9<sup>th</sup> International Conference on Catalysis in Membrane Reactors, Lyon, 28 June – 2 July 2009.

**Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2009)** Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. Euromembrane 2009 Conference, Montpellier, 6-10 Sept.

#### 1.4.3. Communications orales

**Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2008)** Mise en œuvre d'un bioréacteur sans bulles pour la production de surfactine par *Bacillus subtilis*. Journée UGéPE Nord-Pas-de-Calais. 22 Mai.

**Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2009)** Bubbleless membrane bioreactor for biosurfactant production. 9<sup>th</sup> International Conference on Catalysis in Membrane Reactors, Lyon, 28 June – 2 July.

**Coutte, F.**, Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P. and Dhulster, P. (2009) Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. Euromembrane 2009 Conference, Montpellier, 6-10 Septembre.

## **2. ETUDE DE L'ADSORPTION DE LA SURFACTINE A L'INTERFACE D'UNE MEMBRANE EN FIBRES CREUSES**

### **2.1. INTRODUCTION**

La surfactine a des comportements particuliers à l'interface air/liquide, comme cela a été décrit de nombreuses fois dans la littérature (Ishigami *et al.*, 1995; Razafindralambo *et al.*, 1996; Deleu *et al.*, 1999b; Deleu *et al.*, 2003; Kell *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009). Au regard des quantités de surfactine désorbées lors des lavages des différentes membranes après leurs utilisations lors des fermentations précédemment décrites et afin de mieux comprendre le phénomène d'adsorption qui a eu lieu dans ces expériences, une étude d'adsorption a été menée. Cette étude se décompose en trois points.

En premier lieu, comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent la surfactine semble s'adsorber sur la membrane dès qu'elle est produite et cette adsorption semble avoir une influence sur l'évolution du  $K_{1a}$  au cours des fermentations batch. Une étude de l'adsorption de la surfactine a donc été réalisée selon les mêmes conditions de température, d'agitation et d'aération que celles décrites précédemment (Tableau 8, page 96), avec les trois membranes en fibres creuses utilisées comme contacteurs air/liquide mises en présence d'une solution de surfactine sans cellules (§ 8, page 107).

Ensuite, une étude a été réalisée sur des membranes en fibres creuses de PES utilisées comme contacteur air/liquide, afin d'analyser les cinétiques d'adsorption de la surfactine en fonction de la température, du pH et de la taille des pores (§ 8.1, page 108).

De même, la cinétique d'adsorption de la surfactine a été aussi réalisée sur la membrane de PES de 0,2  $\mu\text{m}$  de porosité utilisée pour la filtration tangentielle de la culture, c'est-à-dire en contact liquide/liquide (§ 8.2, page 109).

### **2.2. ETUDE DE L'ADSORPTION DE LA SURFACTINE SUR UN CONTACTEUR A MEMBRANE EN FIBRES CREUSES LORS D'UN CONTACT AIR/LIQUIDE**

Afin d'analyser le phénomène d'adsorption de la surfactine relevé lors de l'utilisation de membranes en fibres creuses, comme contacteur air/liquide dans nos précédents travaux, des expériences d'adsorption ont été entreprises.

## 2.2.1. Cinétique d'adsorption de la surfactine

Les membranes utilisées dans les fermentations batch sont mises en contact en faisant circuler une solution de surfactine pure à 200 mg/L, débarrassée de toute cellule, et la cinétique d'adsorption est mesurée durant une heure, comme indiqué dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 8.1, page 108). Volontairement, nous avons travaillé avec une concentration en surfactine au-dessus de la CMC car, en conditions de fermentation, la concentration en surfactine du bouillon de culture augmente rapidement au-dessus de cette valeur. Aucune étude de ce type n'a été menée sur la fengycine en raison de sa faible adsorption sur les fibres creuses. Avant et après l'expérience, une mesure du  $K_{La}$  est réalisée selon la méthode du dégazage à l'azote. De même, à la fin de l'expérience, les procédures de lavage sont réalisées et la surfactine désorbée est quantifiée par CLHP (§ 6.2.3, page 99). La cinétique d'adsorption de la surfactine sur ces membranes est montrée ci-dessous (Fig. 39, page 139). La quantité de surfactine adsorbée sur la membrane au cours du temps ( $M_t$ ) est calculée selon l'équation (2), page 107.

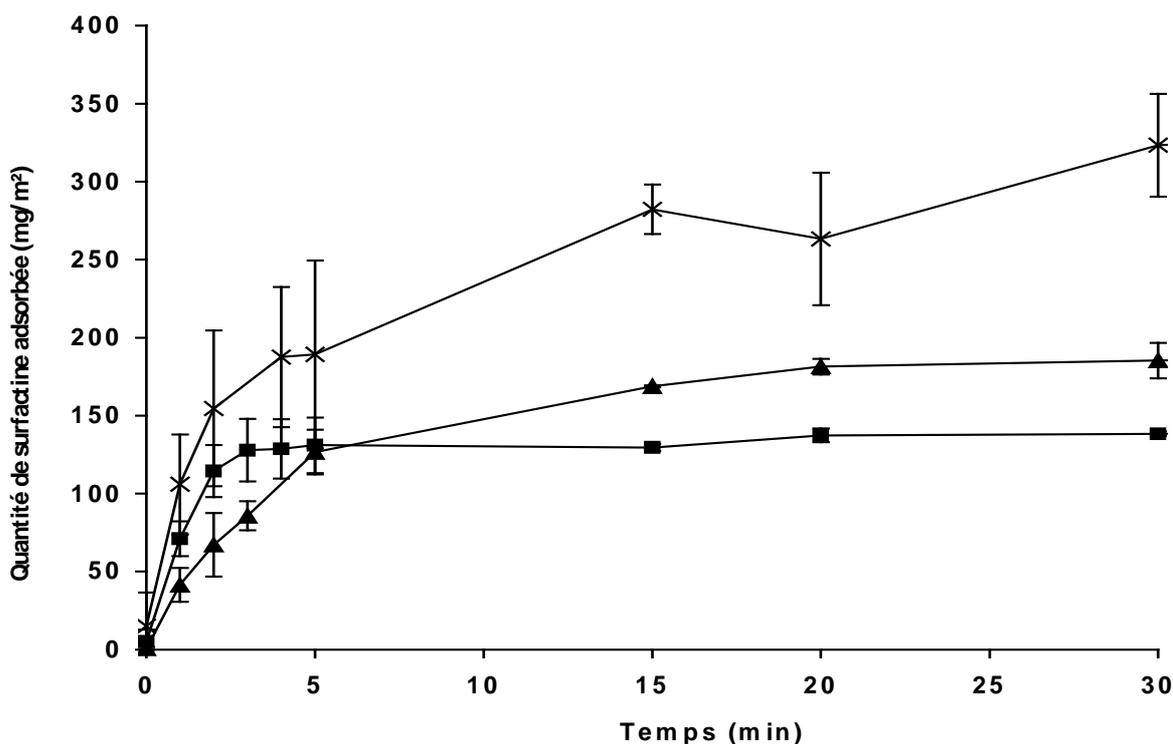


Fig. 39 Cinétique d'adsorption de la surfactine à l'interface air/liquide des différentes membranes en fibres creuses utilisées lors des fermentations batch. Ces expériences sont conduites en trois exemplaires à pH 7,0 et à une température de 30°C. Une solution de surfactine à 200 mg/L est mise en contact avec les fibres creuses dans les mêmes conditions d'agitation et d'aération que celles des fermentations de *B. subtilis*. ▲ Membrane 1 Amersham (BB1, 2,5 m<sup>2</sup>, 0,65 μm). ■ Membrane 2 Medos (BB2, 1,9 m<sup>2</sup>, 0,2 μm). ★ Membrane 3 Spectrum Labs (BB3, 0,375 m<sup>2</sup>, 0,05 μm).

Cette étude montre que l'adsorption de la surfactine à l'interface air/liquide d'une membrane en fibres creuses est un phénomène rapide durant quelques minutes pour les membranes en polypropylène et quelques dizaines de minutes pour la membrane en polyéthersulfone. Comme présenté sur la Fig. 39, la surfactine est rapidement adsorbée et ensuite sa concentration résiduelle se stabilise à 35 mg/L avec la membrane en PES de 2,5 m<sup>2</sup>, 120 mg/L avec la membrane en PP de 1,9 m<sup>2</sup> et 140 mg/L avec la membrane submergée en PP de 0,375 m<sup>2</sup>.

La quantité de surfactine adsorbée sur la membrane en PES atteint 200 mg/m<sup>2</sup>, ce qui est comparable à la valeur mesurée lors de la désorption de la surfactine par les lavages réalisés après la fermentation. La capacité d'adsorption de la membrane externe en polypropylène (BB2) est plus faible que celle de la membrane en polyéthersulfone (BB1) (Tableau 12, page 140).

En revanche, la capacité d'adsorption de la membrane submergée en polypropylène (BB3) est 4 fois plus élevée (530 mg/m<sup>2</sup>). Les quantités de surfactine adsorbées sur les trois membranes en fibres creuses sont du même ordre de grandeur que celles trouvées lors des cultures batch de *B. subtilis*, mais légèrement plus élevées lors du test d'adsorption sans cellules, par comparaison aux quantités désorbées après les procédés de fermentation. La composition de la membrane semble donc influencer l'absorption de la surfactine.

Tableau 12 Lavage des membranes : Etude de la désorption de la surfactine

Désorption de la surfactine <sup>1</sup>	BB 1	BB 2	BB 3
	membrane PES	membrane PP	membrane PP
Après fermentation (mg/m <sup>2</sup> ) <sup>2</sup>	241,80 (SD : 10,20)	68,42 (SD : 5,41)	400,26 (SD : 13,97)
Après l'expérience d'adsorption (mg/m <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	200,50 (SD : 0,88)	133,94 (SD : 10,78)	530,37 (SD : 28,02)

<sup>1</sup> Quantité de surfactine désorbée par unité de surface de la membrane, après deux lavages en eau à 30°C et deux lavages avec une solution de NaOH 0.1 M pH 10.0 à 50°C, comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 6.2.3, page 99).

<sup>2</sup> Valeurs moyennes de deux expériences.

<sup>3</sup> Valeurs moyennes de trois expériences. SD : Déviation Standard.

L'adsorption de la surfactine rapportée à la surface de la membrane en fibres creuses en PES du BB1 est plus élevée que celle obtenue avec l'utilisation de la membrane en PP du BB2, alors que la taille des pores est de l'ordre du dixième de  $\mu\text{m}$  pour chacune.

En outre, lorsque les deux membranes PP sont comparées, un changement de la taille des pores de la membrane de 0,2 à 0,05  $\mu\text{m}$ , semble influencer l'adsorption de la surfactine. La petite taille des pores semble augmenter l'adsorption de la surfactine à la surface de la membrane.

### 2.2.2. Influence de l'adsorption de la surfactine sur le $K_{La}$

Afin de mieux comprendre l'effet de l'adsorption de surfactine sur l'évolution du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ), une mesure de ce dernier est réalisée avant et après l'expérience d'adsorption (Tableau 13, page 141). Les résultats sont significatifs et nous apportent nombre de précisions. Précédemment, nous avons constaté que la taille des pores modifiait la capacité d'adsorption de la membrane et qu'une petite taille de pores augmente cette capacité. Ce résultat semble se confirmer au niveau de l'évolution du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène.

En effet, une diminution d'environ 1,5 fois est observée pour la membrane en polyéthersulfone (BB1; surface : 2,5 m<sup>2</sup>, la taille des pores : 0,65  $\mu\text{m}$ ). Une légère diminution est observée avec la membrane externe en polypropylène (BB2; surface : 1,9 m<sup>2</sup>, la taille des pores : 0,2  $\mu\text{m}$ ).

Tableau 13 Evolution du  $K_{La}$  des membranes après l'adsorption de la surfactine<sup>1</sup>

Etude du transfert d'O <sub>2</sub> ( $K_{La}$ )	Bioréacteur sans bulles 1	Bioréacteur sans bulles 2	Bioréacteur sans bulles 3
$K_{La}$ initial ( $h^{-1}$ )	39,36 (SD : 0,09)	8,99 (SD : 0,04)	28,24 (SD : 0,15)
$K_{La}$ après l'adsorption de la surfactine ( $h^{-1}$ )	25,53 (SD : 0,07)	7,61 (SD : 0,02)	2,57 (SD : 0,02)
Diminution du $K_{La}$ (%)	35	15	91

<sup>1</sup> Valeurs moyennes de trois expériences. SD : Déviation Standard.

Par contre, le  $K_{La}$  diminue de 11 fois après 1 h de contact entre la solution de surfactine et la membrane immergée en polypropylène (BB3; surface : 0,375 m<sup>2</sup>, la taille des pores : 0,05 µm). Avec une taille de pores de 0,05 µm (BB3), le  $K_{La}$  est réduit à 92% de la valeur initiale, sans doute en raison de l'obstruction des pores par la surfactine (Tableau 13, page 141). Plusieurs auteurs ont étudié le comportement et l'organisation moléculaire de la surfactine aux interfaces (Ishigami *et al.*, 1995; Maget-Dana et Ptak, 1995; Deleu *et al.*, 1999a). Ils ont indiqué que la surfactine pouvait avoir plusieurs conformations moléculaires en monocouche qui ont des orientations différentes à l'interface air/eau et des tailles différentes de 10 à 115 nm quand elle est organisée sous forme de complexes supra-micellaires. Ces structures micellaires de la surfactine peuvent facilement bloquer les pores de 50 nm de la membrane en fibres creuses de PP.

### 2.3. PARAMETRES INFLUENÇANT L'ADSORPTION DE LA SURFACTINE SUR UN CONTACTEUR A MEMBRANE EN FIBRES CREUSES LORS D'UN CONTACT AIR/LIQUIDE

Pour caractériser l'adsorption de la surfactine, une étude sur la cinétique d'adsorption de la surfactine à l'interface air/liquide est menée. Les membranes utilisées comme contacteur air-liquide sont des membranes en fibres creuses en polyéthersulfone dont les tailles des pores sont de 0,65 µm (0,12 m<sup>2</sup>) et de 0,2 µm (0,11 m<sup>2</sup>) (GE Healthcare). L'influence de la température et de la taille des pores est étudiée.

Le but de cette étude est de construire les cinétiques d'adsorption de la surfactine à 20°C, 30°C, 40°C et à pH 7. Les expériences ont été doublées, les courbes présentées sur la figure 40 sont les courbes moyennes des deux expériences. L'écart type varie de 2 à 15%.

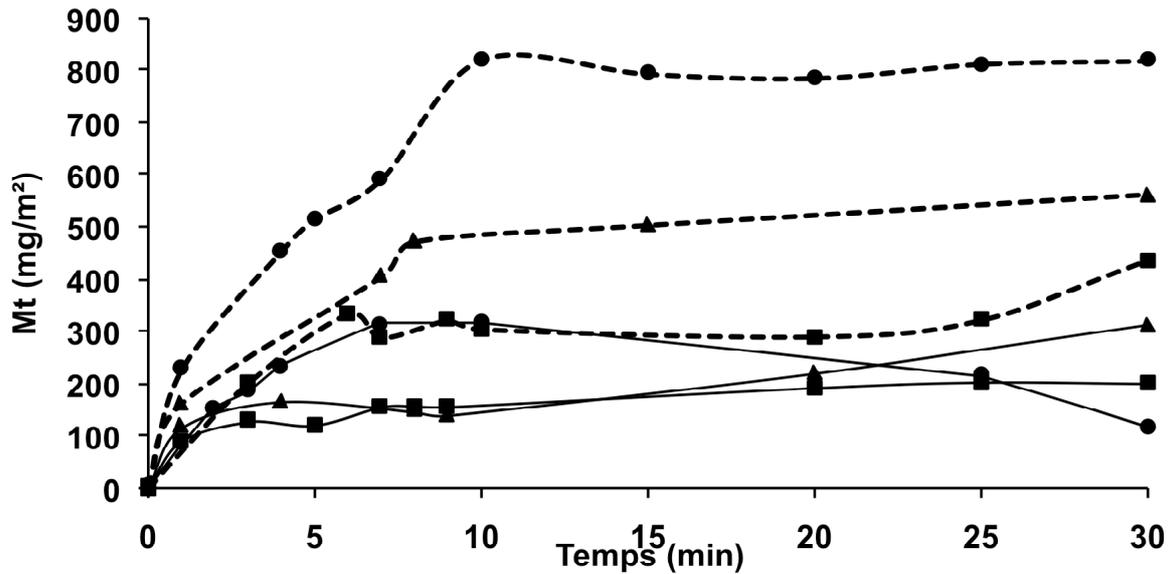


Fig. 40 Evolution de l'adsorption de la surfactine à l'interface air/liquide de membranes en fibres creuses de polyéthersulfone en fonction de la température. Ces expériences ont été réalisées en double exemplaire à pH 7 avec une solution de surfactine à 100 mg/L pendant 30 min. ■ à 20°C ; ▲ à 30°C ; ● à 40°C . Lignes pleines : membrane 0,65µm, 0,12 m<sup>2</sup> ; Lignes en pointillés : membrane 0,2µm, 0,11 m<sup>2</sup>.

Les résultats présentés ci-dessus (Fig. 40, page 143) mettent en relief plusieurs phénomènes. Tout d'abord comme montré lors de l'expérience précédente, il peut être observé que le phénomène d'adsorption est rapide et qu'une saturation de la membrane a lieu après 10 min. La quantité de surfactine adsorbée sur la membrane se stabilise alors à une valeur qui semble dépendre de plusieurs paramètres.

Tout d'abord, la quantité de surfactine adsorbée augmente avec la température, si cet effet est peu marqué sur la membrane ayant une taille de pores de 0,65 µm, il est beaucoup plus significatif sur la membrane ayant une taille de pores de 0,2 µm (Fig. 40, page 143). Différentes quantités adsorbées sont observées avec une taille de pores de 0,2 µm, 300 mg/m<sup>2</sup> à 20°C, 500 mg/m<sup>2</sup> à 30°C et 800 mg/m<sup>2</sup> à 40°C. Pour la membrane de 0,65 µm, il n'y a pas de différence à 20°C et 30°C, l'adsorption devient plus importante à 40°C. De plus les quantités sont plus faibles avec une taille de pores de 0,65 µm. L'adsorption de la surfactine dépend donc aussi de la porosité de la membrane.

La désorption de la surfactine s'effectue par un premier lavage d'une demi-heure à l'eau à 50°C, puis par deux lavages de 30 min chacun à la soude diluée à pH 10 et à 50°C et finalement avec une solution d'hypochlorite de sodium à 100 ppm à 50°C. La majorité de la surfactine est désorbée lors du premier lavage ; lors des lavages suivants, les quantités désorbées étant inférieures à 20 mg/L, il est difficile de les quantifier par HPLC.

#### 2.4. ETUDE DE L'ADSORPTION DE LA SURFACTINE SUR UNE MEMBRANE DE MICROFILTRATION D'EXTRACTION LIQUIDE/LIQUIDE

Les membranes en fibres creuses sont souvent aussi utilisées en filtration pour l'extraction de biomolécules d'une culture. L'utilisation de ce type d'application dans nos futurs travaux demande aussi une étude de l'adsorption de la surfactine lors d'un contact liquide/liquide.

De nombreux auteurs décrivent l'adsorption de molécules et notamment de protéines sur des membranes de microfiltration ou d'ultrafiltration (Nakamura et Matsumoto, 2006; Salgin *et al.*, 2006; Chen et Juang, 2007) et plus particulièrement lors de l'ultrafiltration d'une culture bactérienne contenant de la surfactine (Chen *et al.*, 2008a).

Pour assurer la rétention des cellules, les membranes employées ont souvent un seuil de coupure de 0,2  $\mu\text{m}$ , c'est pourquoi notre étude ne sera effectuée qu'avec cette taille de pores. Dans ce cas précis, il est nécessaire de récolter les échantillons dans le rétentat et dans le filtrat. Deux expériences sont réalisées consécutivement, la première en bloquant le filtrat pendant 30 min. La surfactine à 100 mg/L circule dans le système QuixStand avec un débit de 1 L/min. Ensuite la seconde expérience est réalisée en laissant circuler le filtrat. Le débit de filtration a été fixé à 30 mL/min après une étude préalable du colmatage de la membrane de microfiltration par de la biomasse. Un échantillon est pris dans le rétentat et dans le filtrat final. Les expériences ont été doublées ; les courbes présentées sont les courbes moyennes. L'écart type varie de 2 à 15%.

Nous avons étudié dans ce cas l'adsorption de la surfactine sur la membrane de microfiltration au cours du temps à 20°C, 30°C et 40°C et à pH 7. Ceci nous permet par la suite d'établir les cinétiques d'adsorption de la surfactine.

Les résultats présentés ci-dessous (Fig. 41, page 145) montrent une nouvelle fois que ce phénomène est rapide et que l'augmentation de la température augmente la quantité de surfactine qui s'adsorbe sur la membrane.

Différentes quantités à l'équilibre sont observées : 250 mg/m<sup>2</sup> à 20°C, 300 mg/m<sup>2</sup> à 30°C et 350 mg/m<sup>2</sup> à 40°C. Se retrouvent finalement dans le rétentat, 64,0 mg de surfactine à 20°C, 67,0 mg de surfactine à 30°C, 59,0 mg de surfactine à 40°C.

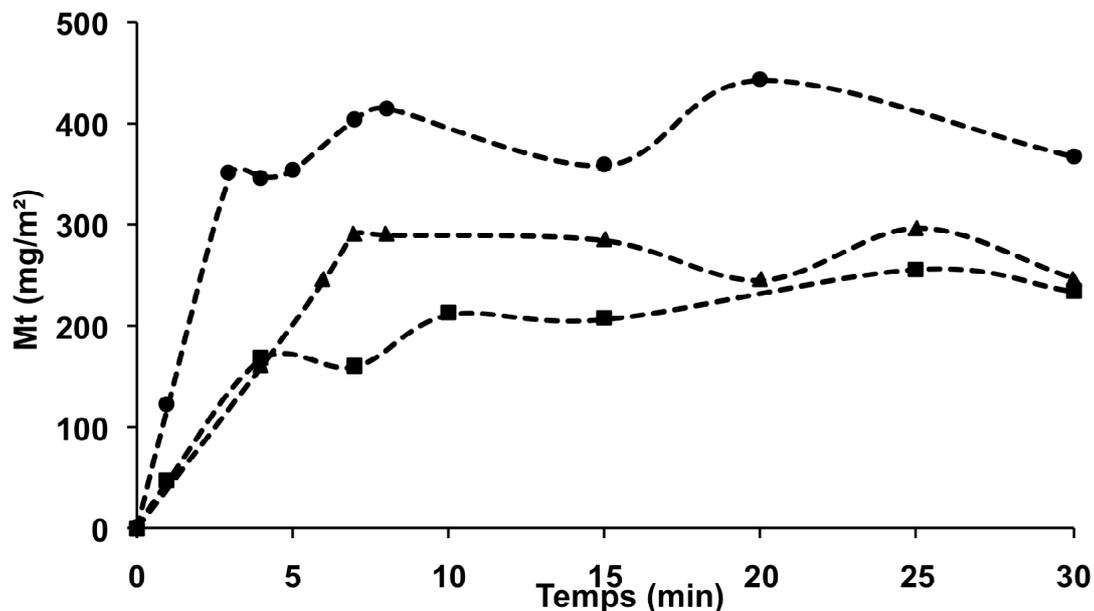


Fig. 41 Evolution de l'adsorption de la surfactine à l'interface liquide/liquide d'une membrane de microfiltration (0,2  $\mu\text{m}$ , 0,11m<sup>2</sup>) en fibres creuses de polyéthersulfone en fonction de la température. Ces expériences ont été réalisées en double exemplaire à pH 7, avec une solution de surfactine à 100 mg/L pendant 30 min, le filtrat étant bloqué. ■ à 20°C ; ▲ à 30°C; ● à 40°C.

Suite à cette expérience, la microfiltration est mise en route, la concentration alors présente dans le rétentat n'est plus de 100 mg/L, du fait qu'une partie s'est adsorbée durant le contact liquide/liquide. Il peut être observé que la quantité de surfactine retrouvée dans le filtrat diminue avec la température (Fig. 42, page 146). Cela est dû au fait qu'une nouvelle quantité de surfactine provenant du rétentat s'adsorbe sur la membrane.

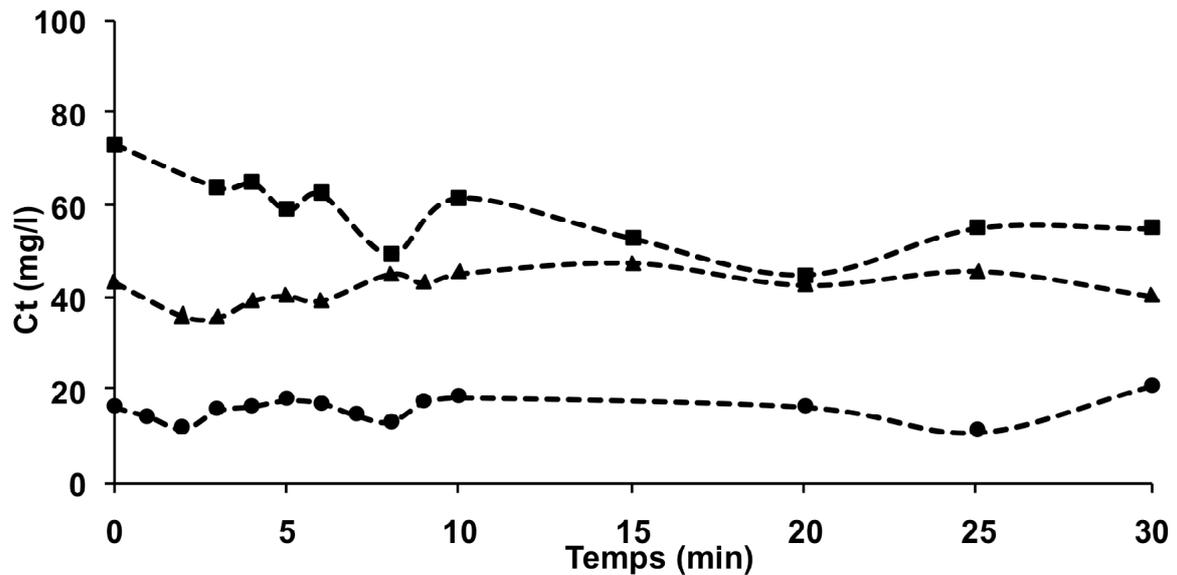


Fig. 42 Evolution de la concentration instantanée de surfactine dans le filtrat en fonction de la température lors de la microfiltration d'une solution de surfactine à 100 mg/L à pH = 7. Ces expériences ont été réalisées en double exemplaire à pH 7. Après 30 min de blocage le filtrat est ouvert à 30 mL/min. ■ à 20°C ; ▲ à 30°C ; ● à 40°C.

Suite à ces deux expériences et aux prélèvements effectués dans le rétentat et dans le filtrat, les rendements de l'extraction de la surfactine durant une microfiltration sur une membrane de porosité 0,2 µm en fonction de la température peuvent être établis. Deux types de calculs peuvent être réalisés, soit en prenant en compte la quantité de surfactine restante dans le rétentat (Tableau 14 [1], page146), soit en ne tenant pas compte de cette quantité (Tableau 14 [2], page146). Dans le tableau ci-dessous, nous remarquons que la quantité de surfactine retrouvée dans le rétentat diminue alors que la température augmente. Ceci est le résultat de l'adsorption de la surfactine sur la membrane qui augmente en fonction de la température, de même que le rendement diminue avec l'augmentation de la température.

Tableau 14 Quantité de surfactine retrouvée dans le rétentat final après microfiltration selon la température

Température (°C)	Quantité dans le rétentat final	Quantité dans le filtrat final	Rendement 1	Rendement 2
20	25,4 (SD = 0,57)	44,8 (SD= 0,99)	60,1%	44,8%
30	22,5 (SD = 10,68)°	39,0 (SD = 1,6)	50,3%	39%
40	21,5 (SD = 7,07)	41,8 (SD = 2,19)	53,2%	41,8%

Grâce à ces données, la quantité de surfactine adsorbée sur la membrane est calculée en additionnant la quantité de surfactine retrouvée dans le rétentat et la quantité de surfactine retrouvée dans le filtrat et en retranchant cette somme de la concentration initiale de la solution de surfactine. Ainsi à 20°C, 29,8 mg de surfactine se sont adsorbés, 38,5 mg à 30°C et 36,7 mg à 40°C.

## 2.5. DISCUSSION

Ces différentes études sur l'adsorption de la surfactine à l'interface des contacteurs air/liquide à membrane ont permis de conforter les observations réalisées lors de nos fermentations précédentes. Ces résultats révèlent tout d'abord une relation entre la taille des pores et la capacité d'adsorption de la membrane microporeuse. Plus la porosité est faible, plus la quantité de surfactine adsorbée à l'équilibre par unité de surface est importante. Cette adsorption provoque une diminution du  $K_{La}$  et de même, celle-ci est d'autant plus importante que la taille des pores est faible.

L'adsorption de la surfactine sur une membrane microporeuse est dépendante aussi de la température. Une augmentation de la température change la micropolarité des monomères de la surfactine et donc la formation des micelles. Certaines études ont montré que les isothermes d'adsorption de la surfactine sont essentiellement du type Langmuir (Liu *et al.*, 2007; Chen et Juang, 2007; Montastruc *et al.*, 2008). Si les résultats présentés ci-dessus semblent montrer une cinétique d'adsorption de la surfactine de type Langmuir, ceux-ci devront être complétés par une analyse de l'effet de la concentration en surfactine sur les quantités adsorbées.

Le comportement de la surfactine peut varier en fonction d'autres paramètres environnementaux, notamment en fonction de sa concentration, de la concentration en sels, de l'hydrophobicité de la membrane et du pH (Ishigami *et al.*, 1995; Osman *et al.*, 1998; Song *et al.*, 2007). Il est probable que la surfactine modifie l'hydrophobicité de la membrane, son comportement étant d'ailleurs différent sur PES et sur PP. Cette modification de surface repose sur la structure amphiphile de ces molécules par l'orientation de la tête peptidique et de la chaîne d'acide gras en fonction du caractère hydrophobe ou hydrophile de la surface (Shakerifard *et al.*, 2009).

Lors de l'adsorption de la surfactine, il semble y avoir un phénomène de saturation de la membrane, au-delà duquel l'adsorption n'a plus lieu et ceci dépend de différents paramètres décrits ci-dessus. Le type de contact semble aussi influencer cette quantité adsorbée. En effet, les résultats présentés permettent de conclure que sur une membrane PES l'adsorption de la surfactine est deux fois plus importante lors d'un contact air/liquide par rapport à un contact liquide/liquide (Fig. 40, page 143 et Fig. 41, page 145).

Les rendements de microfiltration obtenus sont assez faibles mais ils sont directement liés à la faible concentration de surfactine utilisée, celle-ci ayant été volontairement adaptée à l'expérience pour pouvoir mesurer un effet. Un rapport adsorbé/adsorbant plus élevé permet sans doute d'augmenter les rendements de la microfiltration et d'utiliser ce procédé de séparation lors d'une culture continue pour séparer la surfactine du bouillon de culture. Néanmoins, certaines études font part d'une diminution du flux de filtration en relation avec les comportements de la surfactine et notamment avec sa concentration dans le milieu (Chen *et al.*, 2007; Isa *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008a).

Une étude devra être aussi menée pour vérifier l'effet de la surfactine et de son adsorption sur le flux de filtration dans nos conditions de travail. Par ailleurs, ces résultats ont été obtenus avec des solutions ne contenant pas de cellules, ces dernières ayant aussi une affinité pour les membranes ; il serait intéressant de pouvoir vérifier par d'autres analyses l'effet de la présence de cellules sur l'adsorption de la surfactine. Ces travaux ont permis de visualiser et de comprendre le phénomène d'adsorption de la surfactine et confirment la possibilité de l'utilisation d'une membrane en fibres creuses de polyéthersulfone pour l'étape de microfiltration lors d'un procédé continu.

### **3. MISE EN ŒUVRE D'UN PROCÉDE INTEGRE DE PRODUCTION, D'EXTRACTION ET DE CONCENTRATION DE LA FENGYCINE PRODUITE PAR *B. SUBTILIS* ATCC 21332.**

#### 3.1. INTRODUCTION

Lors des travaux présentés précédemment, des procédés innovants de production de lipopeptides sans mousse ont été mis en œuvre avec succès. Les analyses de ces derniers ont mis en évidence une configuration favorisant la production de fengycine. Comme nous l'avons décrit dans la synthèse bibliographique (§ 1.5.3, page 43), la formation de mousse empêche toute extraction des produits biosurfactants directement du bouillon de culture. La résolution de ce problème grâce à l'utilisation d'un contacteur air/liquide à membrane pour aérer le milieu de culture va permettre l'élaboration d'un procédé continu de production auquel sera intégré un système continu d'extraction et de purification des lipopeptides.

Dans cette partie de notre travail, un procédé de production, d'extraction et de purification des lipopeptides de *B. subtilis* a été mis en œuvre. Un fermenteur conventionnel a été modifié par l'intégration d'un contacteur à membrane air-liquide en fibres creuses comme système d'aération pour éviter l'injection d'air, mais aussi d'une membrane de microfiltration, servant au recyclage total de la biomasse et à l'extraction des lipopeptides, et d'une membrane d'ultrafiltration, servant à la concentration et à la purification des lipopeptides dans un compartiment intermédiaire (cuve 3) comme décrit précédemment (§ 6.3, page 100).

#### 3.2. PRODUCTION ET EXTRACTION EN CONTINU DE FENGYCINE ET DE SURFACTINE PRODUITE PAR *B. SUBTILIS* ATCC 21332

La souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été cultivée en mode continu, comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 6.3, page 100). Lors de cette étude, deux paramètres influant sur la culture ont été analysés, à savoir le taux de dilution et le taux d'oxygénation. La culture continue est précédée d'une phase I de démarrage en batch. Cette culture est réalisée dans un bioréacteur sans bulles équipé d'un contacteur air/liquide à membrane immergée en fibre de polypropylène (0,375 m<sup>2</sup>; 0,05 µm). Après 8 h de culture, l'alimentation en milieu frais a été mise en route et des taux de dilution croissants ont été appliqués. Durant la phase II, les débits d'alimentation (F<sub>1</sub>) et de soutirage (F<sub>2</sub>) ont été fixés à 0,35 L/h, soit un taux de dilution (D) d'environ 0,1 h<sup>-1</sup>, puis de 0,2 h<sup>-1</sup> lors de la phase III. Dans la dernière phase IV, l'effet d'une augmentation du transfert d'O<sub>2</sub> a été mesuré en aérant par de l'O<sub>2</sub> pur.

Lors de cette étude, les paramètres physiologiques, tels que la croissance de la biomasse, la concentration en lipopeptides, en substrats et métabolites primaires dans le bioréacteur ont été mesurés, tout comme l'évolution de la quantité de lipopeptides et de métabolites primaires extraits et présents dans la cuve 3, compartiment délimité par la membrane de microfiltration et celle d'ultrafiltration. En outre, les paramètres opérationnels tels que l'oxygène dissous et la consommation d'acide ou de base nécessaire à la régulation du pH ont été suivis, ainsi que le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) qui est mesuré avant et après les cultures.

### 3.2.1. Analyse de l'effet du taux de dilution sur la physiologie de *B. subtilis* ATCC 21332.

#### 3.2.1.1. Analyse de la croissance en milieu de Landy

L'évolution de la biomasse durant les différentes phases de la culture continue est présentée dans la figure ci-dessous. Lors de la phase batch la valeur de l'oxygène dissous chute à 0 après 6 h de culture. Ce résultat est similaire à celui obtenu précédemment (§ 1.2.1, page 123 et Fig. 34, page 125).

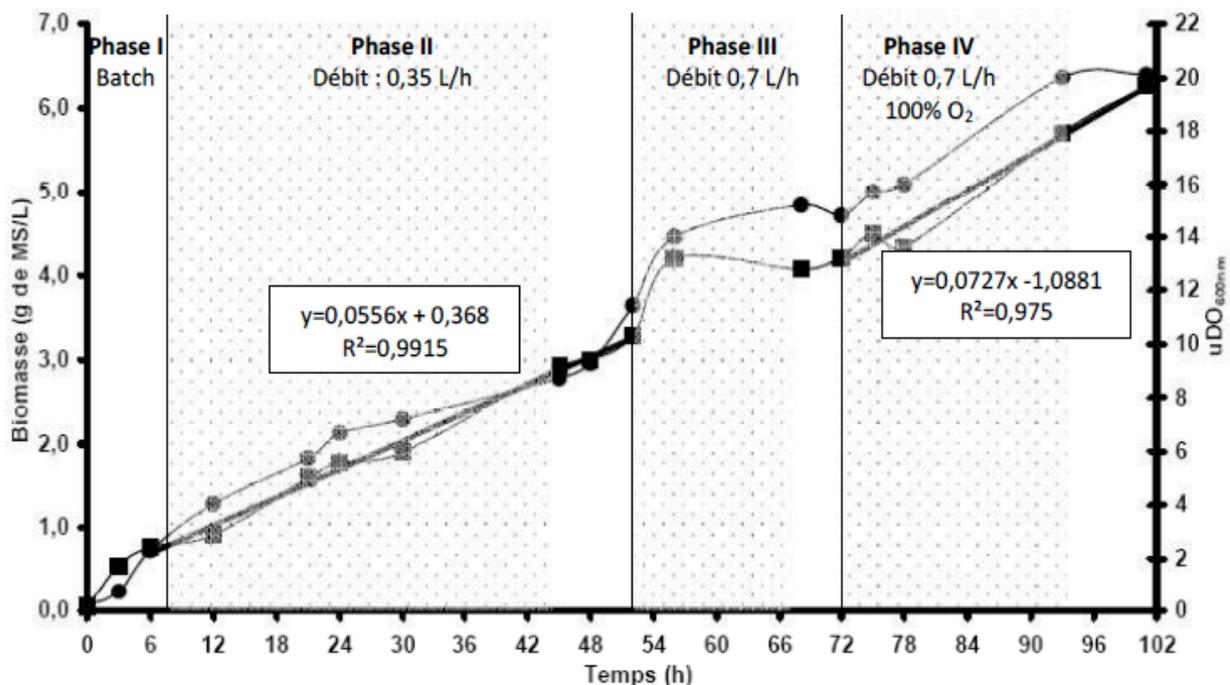


Fig. 43 Evolution de la concentration en biomasse dans le bioréacteur dans différentes conditions de taux de dilution ou d'oxygénation. Culture continue de *B. subtilis* ATCC 21332 à 30°C en milieu de Landy. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par les zones en pointillés. ■ Biomasse (g de M.S./L) ; ● Densité optique à 600 nm.

Durant la première phase de culture en continu (phase II), la biomasse augmente doucement jusqu'à une période stationnaire, où elle atteint une valeur de 3,2 g de M.S./L, cette valeur étant proche de celle obtenue lors de la culture en batch. L'augmentation du taux de dilution entre la phase II et la phase III n'engendre qu'une faible augmentation de la biomasse produite, qui atteint 4,1 g de M.S./L, réfutant l'hypothèse d'une limitation par le substrat, mais révélant la présence d'une autre limitation, peut-être en oxygène.

### 3.2.1.2. Production en continu des lipopeptides

Comme nous l'avons observé précédemment, la souche de *B. subtilis* ATCC 21332 produit à la fois de la surfactine et de la fengycine. La configuration d'aération choisie doit permettre la production majoritaire de fengycine. Les analyses de la production de lipopeptides ont été menées dans le bioréacteur en fonction du temps. Dans la figure ci-dessous, il peut être observé que la production de surfactine commence avant celle de la fengycine, ce qui engendre une saturation rapide de la membrane d'aération. En effet, cette dernière commence à s'accumuler dans le bouillon de fermentation dès la 6<sup>ème</sup> heure de culture, alors que la fengycine apparaît après la 12<sup>ème</sup> heure de la culture.

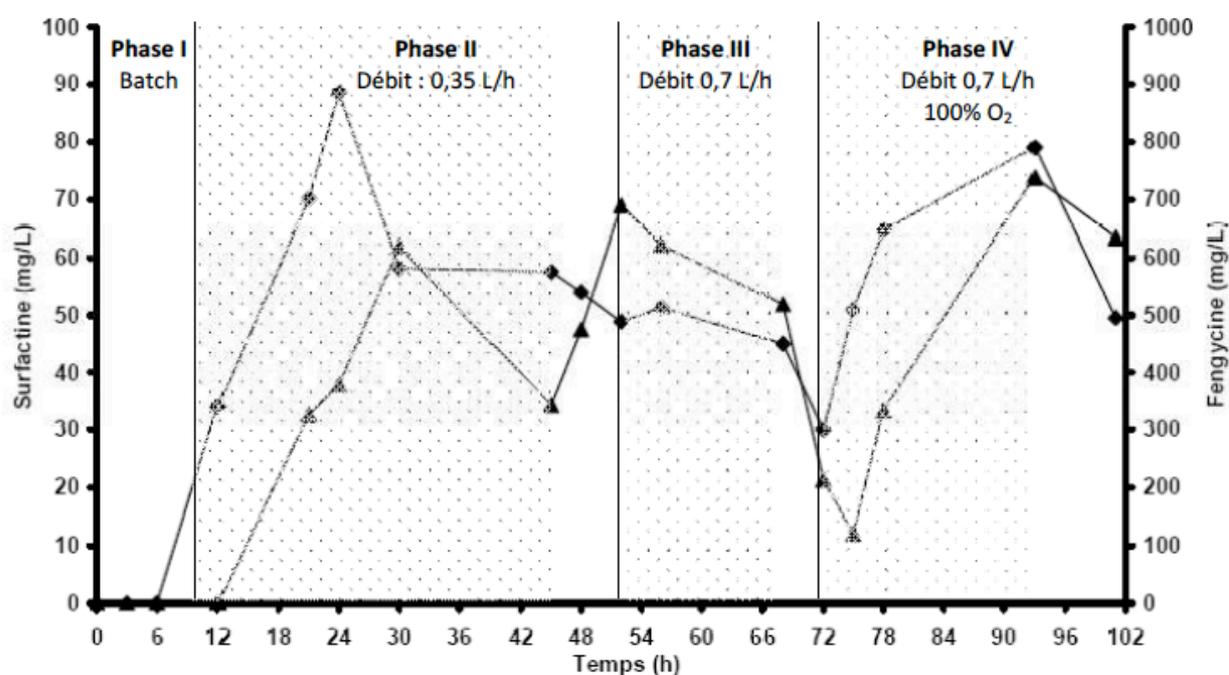


Fig. 44 Evolution de la concentration en lipopeptides dans le bioréacteur durant la culture continue de *B. subtilis* ATCC 21332 dans différentes conditions de taux de dilution ou d'oxygénation. Culture continue à 30°C en milieu de Landy. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par les zones en pointillés. ◆ Surfactine ▲ Fengycine.

Lors de la période stationnaire de la phase II, la concentration de la surfactine dans le bioréacteur est alors de 55 mg/L. Si la concentration de la surfactine est relativement stable, ce n'est pas le cas de celle de la fengycine qui augmente entre la 42<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> heure de culture, celle-ci étant à une valeur moyenne de 500 mg/L durant cette période. Le doublement du taux de dilution durant la phase III ne provoque aucun changement de ces concentrations pendant la phase de transition, mais la concentration en fengycine chute fortement la phase stationnaire. Néanmoins il faut tenir compte de l'augmentation du taux de dilution qui provoque un lessivage dans le bioréacteur. Afin de mieux analyser cet effet, les vitesses de production des lipopeptides seront analysées dans la suite de ce travail.

### 3.2.1.3. Dosage des substrats et des métabolites primaires.

En regard des phénomènes de limitation de croissance relevés précédemment, une étude du métabolisme des cellules a été menée. Celle-ci va permettre d'approfondir l'analyse de la physiologie de la souche et surtout permettre d'évaluer les vitesses des réactions de bioconversion. L'évolution de la concentration des substrats et des métabolites primaires a été suivie dans le bouillon de culture par CLHP, comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 9.5, page 114). Ce dosage a aussi été réalisé dans les autres cuves du procédé. Les vitesses de consommation des substrats et de production de métabolites primaires majoritaires ont été calculées lors des cultures continues et discontinues. De même la régulation du pH a été suivie dans le bioréacteur. Malheureusement nous ne disposons pas pour cette expérience de l'analyse des gaz.

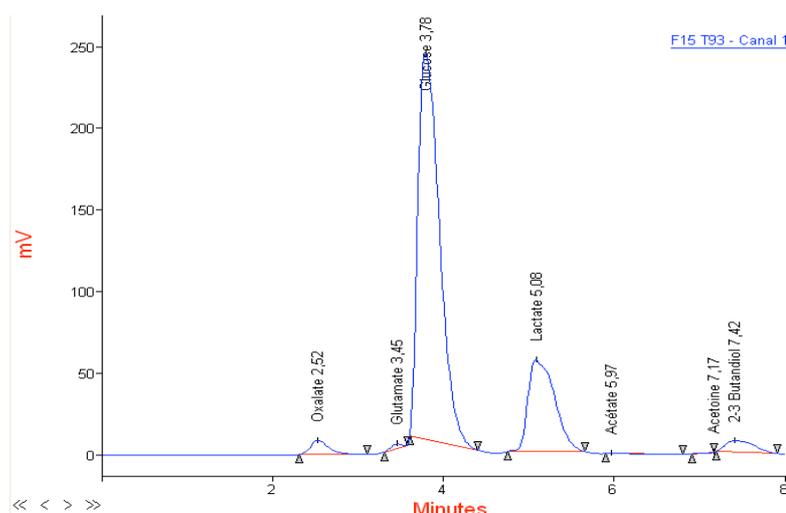


Fig. 45 Chromatogramme du dosage des substrats et des métabolites primaires dans le bioréacteur lors de la culture continue de *B. subtilis* ATCC 21332 après 93 h de culture à 30°C. Les composés du milieu sont identifiés grâce à leur temps de rétention.

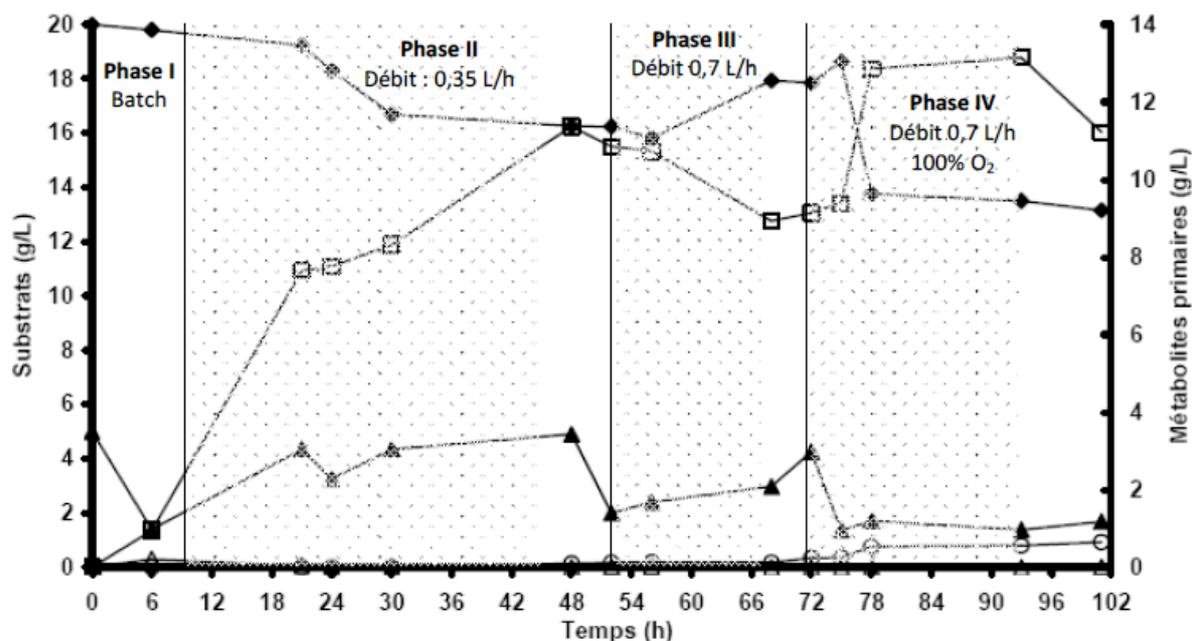


Fig. 46 Evolution de la concentration en substrats et en métabolites primaires dans le bioréacteur durant la culture continue de *B. subtilis* ATCC 21332 avec différentes conditions de taux de dilution et d'oxygénation. Culture continue à 30°C dans le milieu de Landy. L'alimentation du bioréacteur se fait par du milieu de Landy frais et non concentré. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par des zones en pointillés. ◆ Glucose ; ▲ Glutamate ; □ Lactate ; ○ 2-3 butanediol ; ☆ Acétate ; △ Oxalate.

L'analyse des composés dans les cuves 3 et 4 révèle des concentrations quasi similaires de tous les composés par rapport à celles présentes dans la cuve 1, ces composés ne sont donc pas retenus par les membranes de microfiltration et d'ultrafiltration (§ 1.6.2, page 47). Dans la figure ci-dessus (Fig. 46, page 153), il peut être observé que le glucose et l'acide glutamique ne sont jamais limitants lors des phases II et III. La concentration en glucose est respectivement de 16 g/L et de 18 g/L lors de ces phases. Si la concentration en glucose demeure élevée durant ces deux phases, celle du glutamate diminue fortement lors de la croissance de la biomasse au début de la phase II et III. Par ailleurs, l'analyse de la production d'acide organique montre une forte production de lactate qui commence dès la phase batch et reste à un niveau très élevé tout le long de la culture, pour atteindre un maximum de 11 g/L lors de la période stationnaire de la phase II. Cette concentration baisse un peu lors de la phase III mais reste à un niveau élevé de 9,2 g/L. Le bilan carbone de cette expérience (sans tenir compte de la production de CO<sub>2</sub>) est déficitaire, en effet les dosages réalisés révèlent une quantité de carbone produit d'environ 10% supérieure à la quantité de carbone consommé.

La consommation des titrants est suivie dans le bioréacteur pendant toute la durée de la culture. Ce suivi révèle que la culture ne consomme que de la soude, ceci résulte de la forte production de lactate observée auparavant. Les profils de production de lactate et de consommation de soude peuvent d'ailleurs être directement corrélés dans le temps.

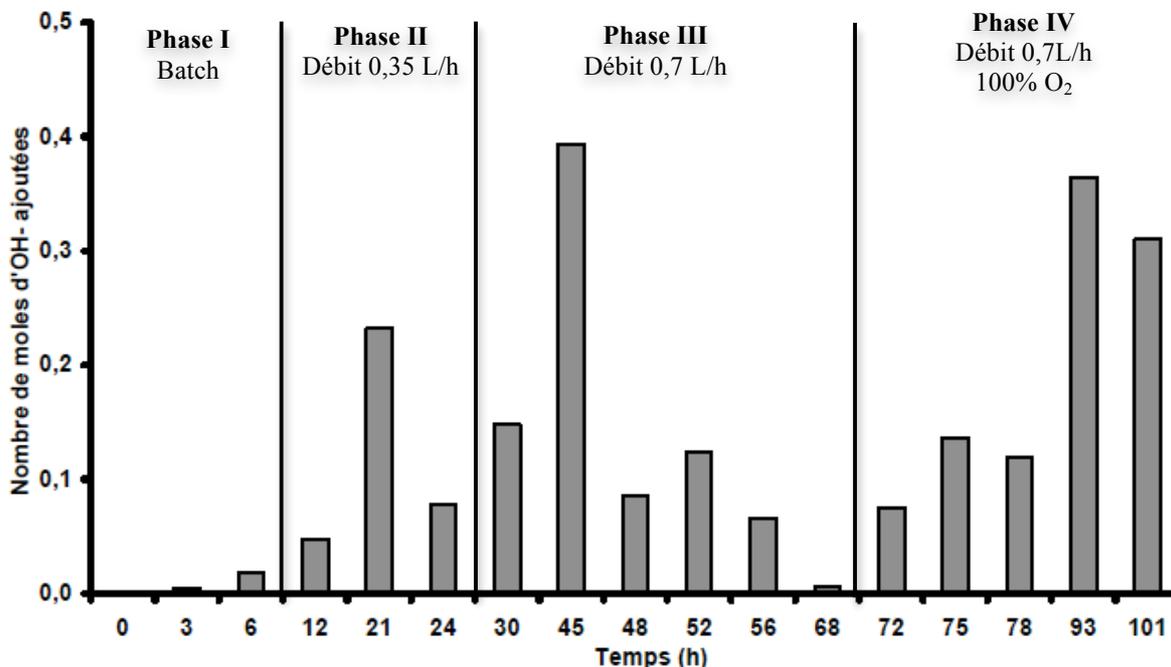


Fig. 47 Evolution de la consommation des titrants durant la culture continue de *B. subtilis* ATCC21332 durant différentes conditions de taux de dilution et d'oxygénation. Culture continue à 30°C dans le milieu de Landy. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par des zones en pointillés. Seule la consommation en soude est présentée car la consommation en acide est nulle.

#### 3.2.1.4. Influence du taux de dilution ou d'oxygénation sur la productivité

Comme décrit précédemment dans la synthèse bibliographique, les différents paramètres de la bioconversion microbienne peuvent être analysés au cours de la fermentation (§ 1.6.1, page 45). Dans cette expérience, il est intéressant de pouvoir mesurer l'effet du taux de dilution appliqué à la culture continue sur la productivité et donc sur les vitesses de production respectives de chacun des produits (Tableau 15, page 155) et ainsi de pouvoir comparer ces données à celles obtenues lors de la fermentation batch décrite précédemment (§ 1.2.2, page 126).

Tableau 15 Evolution des productivités en fonction des conditions de taux de dilution ou d'oxygénation

		Phase II D=0,1 h <sup>-1</sup>	Phase III D=0,2 h <sup>-1</sup>	Phase IV D=0,2 h <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> 100%	Batch <sup>1</sup>
X	(g/L)	3,3	4,2	6,2	3,9
S	(g/L)	16	18	13	4
r <sub>X</sub>	(g/L/h)	0*	0*	0*	0,323
r <sub>P</sub> surfactine	(mg/L/h)	5,5	10	16	19,8
Y <sub>P/S</sub> surfactine	(mg/g)	12,5	25	10,2	11,7
r <sub>P</sub> fengycine	(mg/L/h)	50	100	148	13,5
Y <sub>P/S</sub> fengycine	(mg/g)	125	250	105	24,6
r <sub>S</sub> glucose	(g/L/h)	0,4	0,4	1,3	ND
r <sub>S</sub> glutamate	(g/L/h)	0,3	0,6	0,6	ND
r <sub>P</sub> lactate	(g/L/h)	1,1	1,8	2,6	ND

<sup>1</sup> Les paramètres sont calculés à la fin de la phase de croissance linéaire.

\* La vitesse de croissance de la biomasse en suspension est considérée comme nulle ou négligeable durant les périodes stationnaires.

Lors de la période stationnaire de la phase II, les vitesses de production respectives de la surfactine et de la fengycine sont de 5,5 mg/L/h et 50 mg/L/h. Le doublement du taux de dilution durant la phase III provoque un doublement de ces vitesses. Comparés à ceux obtenus en batch, ces résultats montrent que les vitesses de production de la surfactine sont plus faibles que lors du batch. Par ailleurs, le rendement de conversion du glucose en surfactine (Y<sub>P/S</sub>) est sensiblement identique lors de la phase II en comparaison à celui obtenu lors de la culture en batch.

L'effet de la culture continue est plus marqué sur la production de fengycine. Les vitesses de production de la fengycine sont bien plus élevées durant les phases de la culture continue par rapport à la culture en batch, atteignant une valeur presque 10 fois supérieure lors de la phase III. Le rendement de conversion de glucose en fengycine suit d'ailleurs la même augmentation.

L'analyse de la vitesse de consommation du glucose reste inchangée entre la phase II et la phase III, mais celle du glutamate double avec l'augmentation du taux de dilution.

Les vitesses de production du lactate au cours des différentes phases peuvent être aisément calculées. Elles sont respectivement de 1,1 g/L/h, et de 1,8 g/L/h lors des phases II et III. Cette forte production de lactate doit sûrement résulter d'une forte limitation en oxygène durant la culture ; ce résultat conforte l'avis émis précédemment lors de l'analyse de la croissance mais demande une analyse plus approfondie.

3.2.1.5. *Analyse de l'effet du taux de transfert d'oxygène sur la physiologie de B. subtilis ATCC 21332.*

Afin de vérifier si les limitations dans la consommation de glucose et dans la croissance observées au cours de la phase III sont dues à une limitation en oxygène, le taux de transfert de ce dernier a été augmenté au cours de la phase IV en injectant de l'oxygène pur à la place de l'air. Ce changement ne provoque pas la remontée de l'oxygène dissous.

Comme présenté dans la figure précédente (Fig. 43, page 150), l'augmentation du transfert d'oxygène engendre une reprise de la croissance qui atteint 6,2 g de M.S./L durant la période stationnaire de la phase IV. Ce dernier résultat semble confirmer que la limitation de la croissance durant la phase III est causée par une limitation d'oxygène et non par une limitation de substrat. Par ailleurs à la fin de cette étude, le lavage de la membrane d'aération permet le décrochage de 5,58 g de M.S., de même que 2,09 g de M.S. sont décrochés lors du lavage de la membrane de microfiltration, soit une biomasse totale formée de 26,27 g de M.S. lors de cette expérience.

De même, l'augmentation du transfert d'oxygène au cours de la phase III permet une augmentation de la production de la surfactine et de la fengycine, les concentrations de ces dernières atteignent respectivement 80 mg/L et 740 mg/L (Fig. 44, page 151) et des vitesses de production qui atteignent respectivement 16 mg/L/h et 148 mg/L/h (Tableau 15, page 155).

L'augmentation du transfert d'oxygène lors de la phase IV permet un regain de croissance comme nous l'avons vu précédemment et donc une augmentation de la consommation du glucose, qui voit sa concentration diminuée de 18 g/L à 13 g/L. La vitesse de consommation du glucose augmente d'un facteur 3 entre la phase III et la phase IV pour atteindre une valeur de 1,3 g/L/h (Fig. 46, page 153 et Tableau 15, page 155).

Une légère production de 2-3 butanediol apparaît lors de la phase IV. Si tous ces paramètres révèlent bien une limitation en oxygène durant les phases II et III, l'augmentation de la vitesse de production du lactate qui atteint 2,6 g/L/h, montre que la culture doit être encore limitée en oxygène malgré l'augmentation de son taux de transfert.

A la fin de cette expérience, il devient nécessaire d'évaluer le colmatage des membranes et notamment de la membrane d'oxygénation puisque l'augmentation de la concentration en oxygène semble ne pas être suffisante pour fortement augmenter les productivités.

### 3.2.2. Extraction et concentration en continu des lipopeptides

Durant cette expérience, les quantités de lipopeptides produites sont extraites continuellement du bioréacteur par la membrane de microfiltration et se retrouvent concentrées dans la cuve intermédiaire (cuve 3) grâce à la séparation des lipopeptides et du bouillon de culture par la membrane d'ultrafiltration.

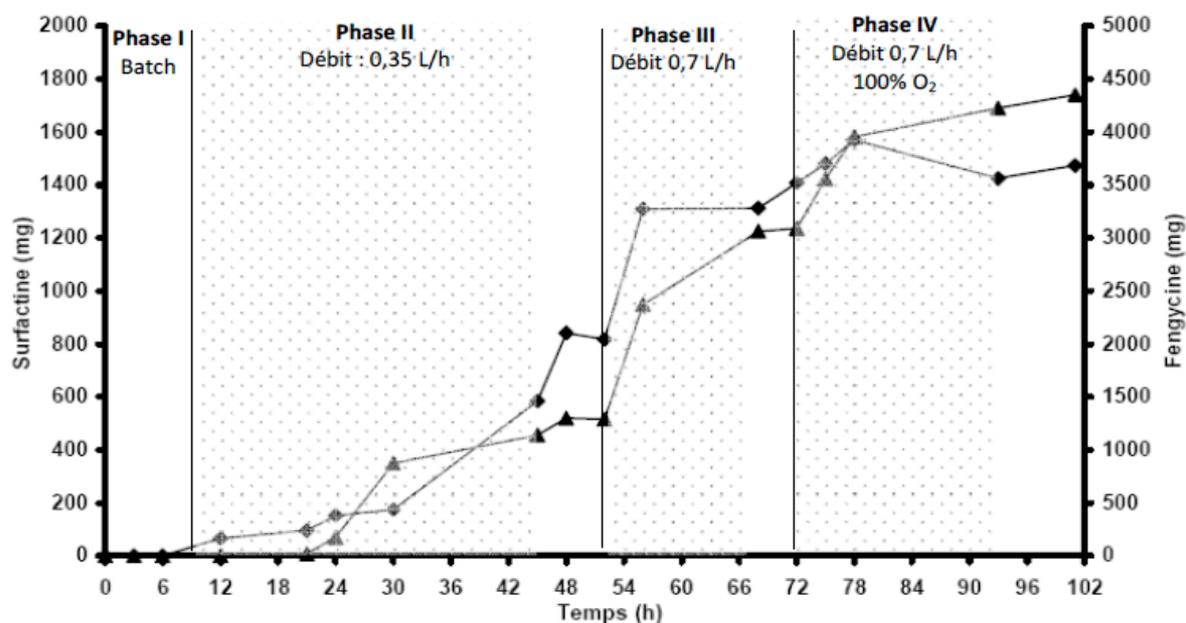


Fig. 48 Evolution de la quantité de lipopeptides accumulée dans la cuve 3 durant la culture continue de *B. subtilis* ATCC 21332 en fonction des conditions de taux de dilution et d'oxygénation. Culture continue à 30°C dans milieu de Landy. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par des zones en pointillés. ◆ Surfactine ▲ Fengycine.

L'accumulation ayant lieu en continu lors des différentes phases de culture, nous pouvons observer sur la figure ci-dessus que les quantités de surfactine et de fengycine accumulées après les différentes phases sont respectivement de 800 mg et de 1400 mg après la phase II, de 1400 mg et 3100 mg après la phase III et de 1500 mg et 4400 mg après la phase IV.

Ces résultats montrent une diminution de la production de surfactine durant la phase IV. L'analyse des lipopeptides dans la cuve 4 montre qu'aucun de ces deux lipopeptides ne passe à travers les pores de la membrane d'ultrafiltration et sont donc bien retenus et concentrés dans la cuve 3 (données non présentées).

### 3.3. ETUDE DU COLMATAGE DES MEMBRANES

#### 3.3.1. Lavage des membranes

Comme nous l'avons réalisé lors des cultures batch, les membranes ont été lavées après l'expérience (§ 6.2.3, page 99 et § 6.3.4, page 105). Lors de chaque étape de lavage, la biomasse désorbée est mesurée tout comme la quantité de lipopeptides, ces informations sont reportées dans le tableau ci-dessous (Tableau 16, page 158). Le colmatage de la membrane d'aération a été évaluée grâce à une mesure du  $K_{La}$  à la fin de la phase IV de la culture. Le colmatage des membranes de filtration est évaluée par une mesure du débit standard en eau.

Tableau 16 *Lavage des membranes : Etude de la désorption de la biomasse et des lipopeptides\**

<b>Membrane</b>	<b>Biomasse (g M.S.)</b>	<b>Surfactine (mg)</b>	<b>Fengycine (mg)</b>
<i>Oxygénation</i>	5,58	46	0
<i>Microfiltration</i>	2,09	7	0
<i>Ultrafiltration</i>	0	110	611
<b>TOTAL</b>	7,67	163	611

\* Quantités désorbées des différentes membranes, après deux lavages en eau à 30°C et deux lavages avec une solution de NaOH 0,1 M pH 10.0 à 50°C, comme décrit dans « Matériels et Méthodes » (§ 6.2.3, page 99 et § 6.3.4, page 105).

Ces lavages révèlent qu'une quantité très importante de biomasse s'est adhéree sur la membrane d'oxygénation (5,58 g M.S.), cette valeur est beaucoup plus importante que celle obtenue lors de la culture batch, il en est de même sur la membrane de microfiltration (2,09 g M.S.). De plus, des quantités non négligeables de lipopeptides sont désorbées majoritairement de la membrane d'ultrafiltration. C'est ainsi que les différents lavages ont permis de récupérer 163 mg de surfactine et 611 mg de fengycine.

3.3.2. Evolution du  $K_La$ 

A la fin de l'expérience, une mesure du  $K_La$  de la membrane d'oxygénation est réalisée selon la méthode du dégazage à l'azote comme décrit le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 9.8, page 115). La valeur de celui-ci après près de 100 h de culture est de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , soit 470 fois moins que celui-ci obtenu avec la membrane propre ( $28,24 \text{ h}^{-1}$ ).

La même mesure mais réalisée cette fois-ci avec de l'oxygène pur permet d'obtenir un  $K_La$  de  $0,28 \text{ h}^{-1}$ . Ce résultat confirme la limitation en oxygène causé par le colmatage de la membrane d'oxygénation par les 5,6 g M.S. de cellules adhérentes et les 46 mg de surfactine.

## 3.3.3. Débit standard en eau des membranes de filtration

A la fin de l'expérience les membranes sont rincées à l'eau, puis la mesure du débit standard en eau est effectuée comme elle avait été réalisée avant l'expérience. Les résultats pour la membrane de microfiltration et pour la membrane d'ultrafiltration sont présentés dans la figure ci-dessous (Fig. 49, page 159). L'évolution du débit standard en eau de la membrane d'ultrafiltration montre une diminution d'un facteur 2 par rapport au débit initial, ce qui indique un faible colmatage (Fig. 49 A, page 159). Par contre, le débit de la membrane de microfiltration est 36 fois plus faible que le débit initial (Fig. 49 B, page 159). Cette forte diminution résulte du colmatage de la membrane par les 2 g M.S. de biomasse restant sur la membrane.

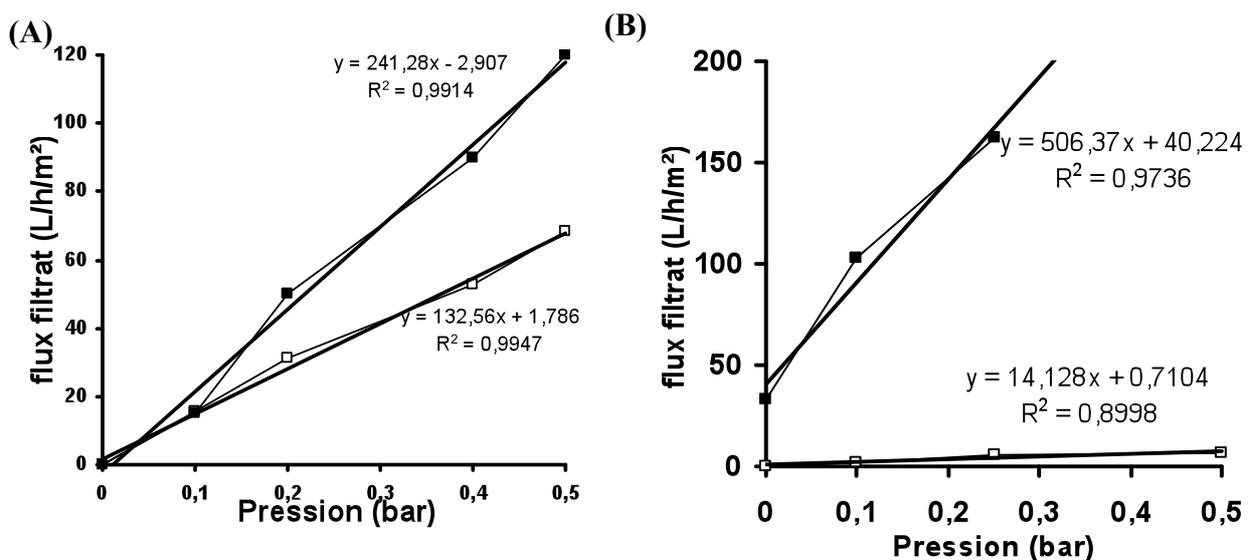


Fig. 49 Evolution des débits standards en eau des membranes d'ultrafiltration (A) et de microfiltration (B). ■ Débit de la membrane propre □ Débit de la membrane après l'expérience.

### 3.4. DISCUSSION

Dans ces travaux, un procédé intégré de production, d'extraction et de purification en continu des lipopeptides de *B. subtilis* ATCC 21332 a été conduit pour la première fois. L'originalité de ce procédé, basé sur la technologie du bioréacteur à membrane, repose sur la combinaison d'un contacteur air/liquide à membrane et des membranes de filtration. Comme nous l'avons démontré précédemment, le contacteur air/liquide à membrane permet la croissance de *B. subtilis* et la production de lipopeptide sans la formation de mousse (§ 1.2, page 122). Néanmoins lors de son utilisation en continu, couplé à un recyclage total de la biomasse, ce procédé n'a pas permis d'obtenir une forte production de biomasse.

En effet, l'analyse de la croissance révèle une production totale de 26,27 g M.S. de biomasse, ce qui demeure un résultat faible quand cette dernière est recyclée totalement. Le facteur limitant majoritairement la production de biomasse semble être le transfert d'oxygène. Cette hypothèse se vérifie premièrement par l'analyse de la concentration en substrat qui montre qu'il n'y a pas de limitation en glucose, ni en glutamate (Fig. 46, page 153), mais aussi, par la forte production de lactate, qui comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, est souvent chez *B. subtilis* le résultat d'une croissance en pseudo-anaérobiose (§ 1.3, page 25). Deuxièmement, le remplacement de l'air par un apport de 100% en oxygène lors de la phase IV, permet une reprise immédiate de la croissance et une augmentation de la vitesse de consommation du glucose. Enfin, la mesure du  $K_{La}$ , réalisée à la fin de la culture, révèle un fort colmatage de la membrane d'aération. Le niveau de biomasse adhérente sur la membrane d'aération est beaucoup plus important que lors de la culture batch.

Dans ces conditions de production et d'extraction continue, après 100 h de culture, la quantité totale de surfactine produite, est de 1,6 g, de même que la production de fengycine est de 6,8 g. Aucun résultat comparable de production de fengycine et de  $Y_{P/S}$  n'a été publié auparavant dans la littérature. Par ailleurs, la quantité de lipopeptides adsorbés sur les différentes membranes ne représente que moins de 10% de la production totale, avec la surfactine majoritairement adsorbée sur la membrane d'oxygénation et la fengycine sur la membrane d'ultrafiltration. La membrane d'ultrafiltration adsorbe aussi de la surfactine. Le rapport des quantités de lipopeptides adsorbés sur cette membrane semble suivre le rapport des quantités produites de chacun de ces lipopeptides.

L'étude de la production de lipopeptides nous a permis d'identifier que le taux de dilution influait directement sur leur vitesse de production, une augmentation du taux de dilution augmentant directement la vitesse malgré la limitation en oxygène. Comparé à une expérience en batch, le mode continu permet en plus de l'extraction et de la purification des lipopeptides d'augmenter jusqu'à 2 fois le rendement de conversion de glucose en surfactine. Le résultat le plus significatif est l'augmentation de la vitesse de production de la fengycine qui est jusqu'à 10 fois supérieure lors de la phase IV par rapport au mode batch. Une augmentation du même ordre de grandeur est observée pour le rendement de conversion du glucose en fengycine (Tableau 15, page 155).

Tous ces résultats montrent l'efficacité du système que nous avons développé pour la production, l'extraction et la purification des lipopeptides. Cette étude nous a permis d'identifier les paramètres limitant le système, plus particulièrement ici le transfert d'oxygène, symbolisé par un  $K_La$  quasi nul à la fin de l'expérience. Cette diminution du transfert est due une fois de plus à l'adhésion des cellules et à l'adsorption de la surfactine sur le contacteur air/liquide à membrane. Mais d'autres paramètres restent encore à étudier pour améliorer les performances de ce procédé, notamment l'impact du recyclage total des cellules. Si le couplage de la membrane de microfiltration est une étape indispensable à l'élimination des cellules, il conviendra néanmoins d'étudier les performances d'un procédé continu ouvert sur la production spécifique de lipopeptides. Par ailleurs, la co-production de la fengycine et de la surfactine rend complexe l'étude plus approfondie du métabolisme et du comportement de chacun des lipopeptides au contact des différentes membranes. Il serait donc intéressant de pouvoir disposer d'une souche mono-productrice de lipopeptide.

C'est dans cette optique que les travaux qui suivent ont été réalisés. Notre intérêt s'est plus particulièrement porté sur la production de surfactine. Notre choix est d'autant plus motivé par la faible production observée avec la souche *B. subtilis* ATCC 21332 lors de la culture en continu. Le recyclage total de la biomasse lors de notre procédé est une condition importante à prendre en compte dans la réalisation de ce nouvel objectif. En effet la synthèse de surfactine est au cœur de mécanismes de régulation complexes (§ 1.4.1.1.1, page 31) et notamment ceux liés au quorum-sensing. Il devient alors important de considérer les effets possibles d'une haute concentration cellulaire sur la production de surfactine. Pour s'affranchir des phénomènes de quorum-sensing, un changement du promoteur gouvernant la synthèse de surfactine sera donc entrepris lors de la réalisation de cet objectif.

#### 4. OBTENTION D'UNE SOUCHE MONOPRODUCTRICE DE SURFACTINE PAR OPTIMISATION GENETIQUE DE *B. SUBTILIS* 168

La souche *B. subtilis* 168 présente plusieurs avantages : i) son génome est complètement séquencé, ii) son temps de génération est court et surtout iii) elle est naturellement compétente. Tous ces avantages en font un outil de choix pour la construction de souches génétiquement modifiées. C'est pourquoi nous l'avons choisie pour concevoir une souche capable de produire une seule famille de lipopeptides, la surfactine et de manière constitutive.

Les stratégies qui ont été mises en œuvre pour réaliser cet objectif sont résumées ci-dessous. La mise en œuvre de ces stratégies a demandé un gros travail de biologie moléculaire, générant de nombreux résultats en gel d'agarose, correspondant à la vérification de chaque étape. Pour ne pas alourdir ce document par tous ces résultats, seuls les résultats obtenus lors de la réalisation du troisième objectif seront présentés.

- Premièrement, comme indiqué dans la synthèse bibliographique la souche *B. subtilis* 168 possède un gène *sfp* codant pour la formation d'une 4'-phosphopantéthéine transférase tronquée qui empêche toute synthèse par la voie des NRPS. Il a donc été indispensable de réactiver la voie des NRPS en intégrant dans la souche *B. subtilis* 168 la séquence d'un gène *sfp* fonctionnel originaire de *B. subtilis* ATCC 21332.
- Deuxièmement, dans l'optique de remplacer le promoteur de l'opéron *srfA* par un promoteur constitutif, les forces des promoteurs  $P_{srfA}$  et  $P_{repU}$  seront comparées chez *B. subtilis* 168 par insertion, au locus *amyE*, de ces derniers fusionnés avec le gène *lacZ*.
- Troisièmement, le promoteur  $P_{srfA}$  a été remplacé par le promoteur  $P_{repU}$ , originaire du plasmide répliatif pUB110 de *Staphylococcus aureus*, et associé à une cassette de résistance à la néomycine. Ce remplacement a été effectué à deux loci différents en amont de l'opéron *srfA*.
- Enfin, le gène *ppsA* codant pour la synthèse de plipastatine chez *B. subtilis* 168 a été interrompu par insertion d'une cassette de résistance à la spectinomycine.

- De même chez certaines souches, des manipulations génétiques pour bloquer la sporulation ont été entreprises en interrompant l'opéron *spoIIIA* par une cassette de résistance à la spectinomycine. Cet opéron non pléiotropique code chez *B. subtilis* pour le stade III de ce phénomène (Illing et Errington, 1991).

Les propriétés phénotypiques telles que l'activité hémolytique, la capacité de colonisation d'un milieu solide, la capacité à sporuler et les activités antibactériennes et antifongiques de la souche parentale et de ses différents dérivés ont été déterminées ainsi que la production de lipopeptides dans les différents milieux de culture. Ces résultats ont permis de mettre en exergue les effets synergiques et/ou antagonistes de la production de surfactine et de plipastatine.

#### 4.1. MODIFICATIONS GENETIQUES DE *B. SUBTILIS* 168

##### 4.1.1. Introduction

Le premier objectif de ces travaux est de réaliser des modifications génétiques de *B. subtilis* 168 afin de créer un mutant surproducteur de surfactine. Mais ils nous permettront aussi d'évaluer l'impact d'une synthèse constitutive de surfactine combinée à une interruption de la synthèse de plipastatine sur le phénotype de la souche.

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la souche *B. subtilis* 168 possède l'opéron *srfA* codant pour la synthèse de la surfactine et l'opéron *pps* codant pour la synthèse de la plipastatine (Tsuge *et al.*, 1999). Mais cette souche est incapable de produire ces lipopeptides en raison de l'absence d'un gène *sfp* fonctionnel ( $Sfp^0$ ) (Nakano *et al.*, 1988).

##### 4.1.2. Rétablissement de la synthèse de lipopeptides chez *B. subtilis* 168

Tout d'abord, la synthèse des lipopeptides a été rétablie par insertion d'un gène *sfp* fonctionnel provenant de la souche *B. subtilis* ATCC 21332 au niveau du locus *amyE*, comme cela a déjà été réalisé (Lee *et al.*, 2005). Deux mutants  $Sfp^+$ , nommés BBG111 et BBG112, ont été générés (§ 4.1, page 81). Ces constructions ont été vérifiées par test d'activité de l'amylase (Fig. 50, page 164) et par repiquages successifs (§ 3.9, page 79).

Comme observé sur le test de l'amylase (Fig. 50 , page 164), la souche BBG111 ne présente aucune activité amylase. Ce qui n'est pas le cas de la souche BBG112 qui présente, elle, une activité. Ce résultat permet de conclure que l'insertion de *sfp* ne s'est pas réalisée par recombinaison homologue au locus *amyE*, chez cette dernière souche.

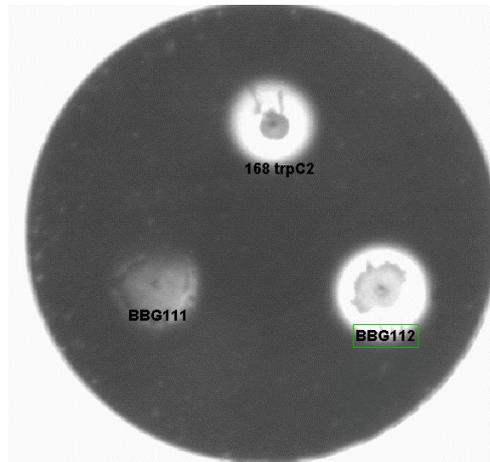


Fig. 50 Test « amylase » de vérification des souches BBG111 et BBG112 en comparaison avec *B. subtilis* 168

Ces constructions ont été vérifiées par PCR, grâce aux amorces *amyE* listées dans le Tableau 6, page 69. L'amplification PCR du locus *amyE* a été réalisée avec des amorces externes au plasmide utilisé pour la recombinaison. Elle confirme que dans la construction BBG112, la recombinaison homologue ne s'est pas faite au locus *amyE*. En effet, aucune bande n'est observée à 5000 pb, alors que celle-ci est présente chez BBG111.

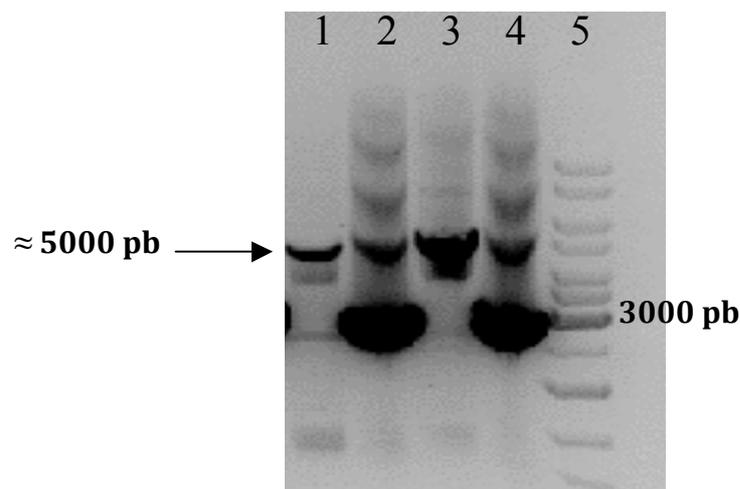


Fig. 51 Vérification de l'insertion du gène *sfp* au locus *amyE* chez les dérivés de *B. subtilis* 168. Piste 1 : BBG111 ; Piste 2 : BBG112 ; Piste 4 : *B. subtilis* 168 ; Piste 5 : PM, O'GeneRuler

D'autres vérifications par PCR de la souche BBG112 ont permis de mettre en évidence une recombinaison de type Campbell au locus *sfp* lui-même. La recombinaison de type Campbell est caractérisée par la présence d'un seul crossing-over et l'intégration de l'ensemble du plasmide, ce qui rend la construction moins fiable. Dès lors, seule la souche BBG111 sera utilisée pour la suite de nos travaux.

#### 4.1.3. Comparaison de la puissance des promoteurs $P_{srfA}$ et $P_{repU}$ chez *B. subtilis* 168

Bien que l'efficacité du promoteur  $P_{repU}$  constitutif ait déjà été avérée chez *B. subtilis* ATCC 6633 (Tsuge *et al.*, 2001a; Leclère *et al.*, 2005), il était important de vérifier qu'il était aussi efficace chez *B. subtilis* 168 avant d'entreprendre le remplacement de celui de l'opéron *srfA* chez BBG111. Sa force a donc été comparée à celle de  $P_{srfA}$  grâce à une fusion avec le gène *lacZ*.

Les deux promoteurs fusionnés à *lacZ* et au gène de résistance au chloramphénicol ont été insérés dans *B. subtilis* 168 par recombinaison homologue au locus *amyE*. Ces constructions ont été vérifiées par PCR grâce aux amorces *amyE* listées dans le Tableau 6, page 69, par test d'activité de l' $\alpha$ -amylase (non présenté) et par repiquages successifs comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 3.9, page 79).

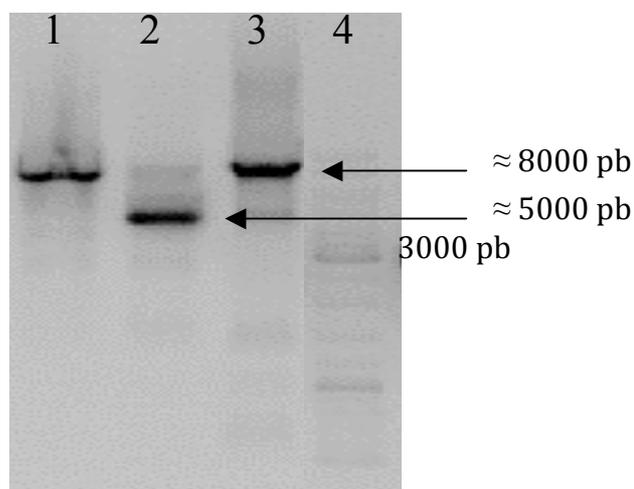


Fig. 52 Vérification de l'insertion des promoteurs  $P_{srfA}$  ou  $P_{repU}$  au locus *amyE* chez les souches BBG127 et BBG1128. Piste 1 : BBG127 ; Piste 2 : *B. subtilis* 168 ; 3 : BBG128 ; Piste 4 : PM, O'GeneRuler.

Les souches modifiées recherchées, nommées BBG127 ( $P_{srfA}$ -*lacZ*) et BBG128 ( $P_{repU}$ -*lacZ*), sont résistantes au chloramphénicol, ne présentent plus d'activité amylase (résultats non présentés) et montrent un fragment d'environ 8000 pb au lieu de 5000 pb après amplification par PCR de l'ADN modifié au locus *amyE*.

La production de  $\beta$ -galactosidase a alors été comparée dans les conditions de culture utilisées pour la production de lipopeptides, soit en milieu de Landy tamponné avec du MOPS 0,1 M.

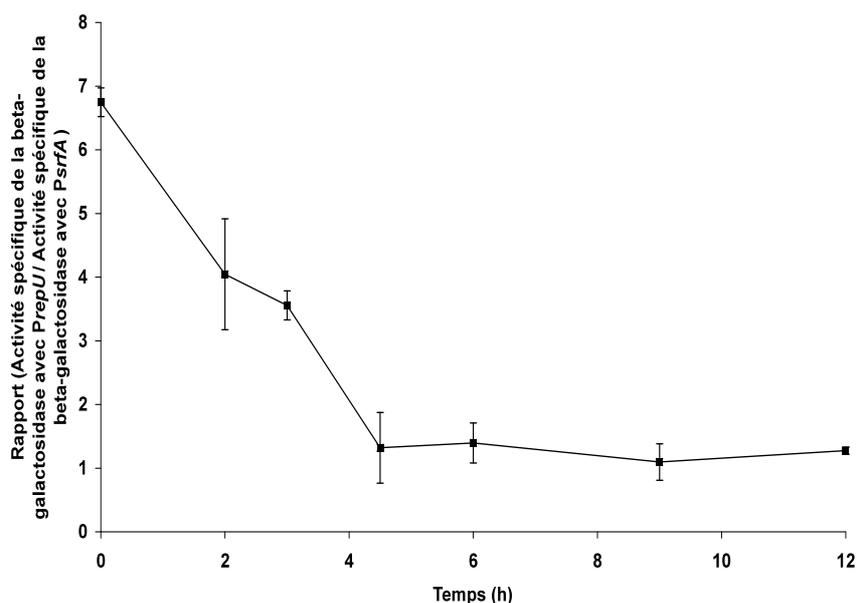


Fig. 53 Comparaison de l'expression des promoteurs  $P_{srfA}$  et  $P_{repU}$  chez *B. subtilis* 168 grâce à une fusion avec le gène *lacZ*. *B. subtilis* BBG127 (*trpC2*, *amyE*:: $P_{srfA}$ -*lacZ* *cat*) et BBG128 (*trpC2*, *amyE*:: $P_{repU}$ -*neo-lacZ* *cat*) sont cultivées dans du milieu Landy MOPS à 37°C sous 130 tpm d'agitation. L'activité spécifique de la  $\beta$ -galactosidase est mesurée à intervalles de temps réguliers et le rapport entre les deux activités spécifiques est présenté.

Comme le montre la figure ci-dessus, l'expression de  $P_{repU}$  est quatre fois plus forte que celle de  $P_{srfA}$  après 3 h de culture. Cette expression demeure supérieure durant les 6 premières heures de culture ( $P_{repU}/P_{srfA} > 1$ ), ce qui correspond à la fin de la phase exponentielle de croissance. Après 6 h de culture, les expressions des deux promoteurs deviennent semblables. Cette expérience montre bien que l'expression du gène dépendant du promoteur  $P_{srfA}$  est induite à la fin de la phase exponentielle de croissance, ce qui n'est pas le cas du promoteur  $P_{repU}$ , dont l'expression est efficace dès le début de la croissance. Le promoteur  $P_{repU}$  montre bien une forte activité chez *B. subtilis* 168, il peut donc être utilisé pour remplacer le promoteur  $P_{srfA}$  dans cette souche. Ceci permettra un contrôle de la production de surfactine, la rendant indépendante des phénomènes de quorum-sensing.

#### 4.1.4. Remplacement du promoteur $P_{srfA}$ par le promoteur constitutif $P_{repU}$ chez *B. subtilis* 168 et BBG111.

Comme cela a été évoqué dans la synthèse bibliographique, l'expression de l'opéron *srfA* est gouvernée par le promoteur natif  $P_{srfA}$ . L'activation de celui-ci est au coeur de nombreux mécanismes de régulation reposant essentiellement sur le quorum-sensing. Par ailleurs, il existe une séquence en amont de cet opéron, qui bien que ne faisant ni partie de la séquence promotrice, ni partie de la séquence codante pour les synthétases, semble être nécessaire à l'expression de l'opéron quand il est sous la gouvernance de  $P_{srfA}$  (Nakano et Zuber, 1991). C'est dans le but de s'affranchir de ces mécanismes de régulation que le promoteur  $P_{srfA}$  a été remplacé par le promoteur constitutif  $P_{repU}$ .

Sur la base des informations révélées par Nakano *et al.* (1991), le remplacement du promoteur natif de l'opéron *srfA* par  $P_{repU}$  a été entrepris à deux endroits différents en amont du premier ORF de l'opéron *srfA* chez *B. subtilis* 168 et dans son dérivé  $Sfp^+$ , BBG111 précédemment construit (Fig. 56, page 168). Ceci a généré d'une part les souches BBG113 et BBG118, chez qui le remplacement a été effectué entre la fin du gène *hxlR* et le site de restriction *HaeIII*, situé 140 pb en amont du RBS de l'opéron *srfA*, et d'autre part les souches BBG113B et BBG118B, chez qui le remplacement a été effectué entre la fin du gène *hxlR* et le RBS de l'opéron *srfA* (§ 4.3, page 83).

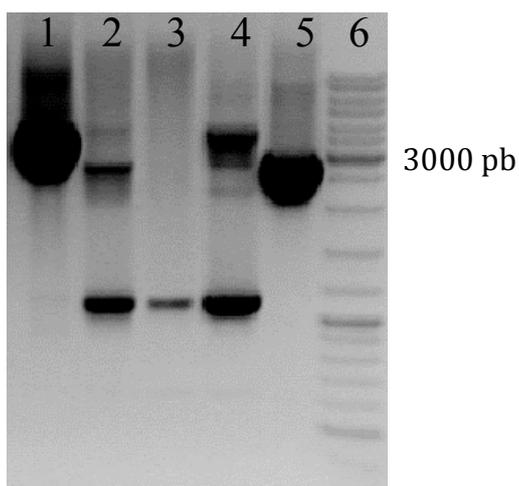


Fig. 54 Vérification de l'insertion du promoteur  $P_{repU}$  *neo* en amont du site *HaeIII* de l'opéron *srfA* chez *B. subtilis* 168 et BBG111. Piste 1 : BBG113 ; Piste 2 : 168 ; Piste 4 : BBG118 ; Piste 5 : BBG111 ; Piste 6 : PM, O'GeneRuler

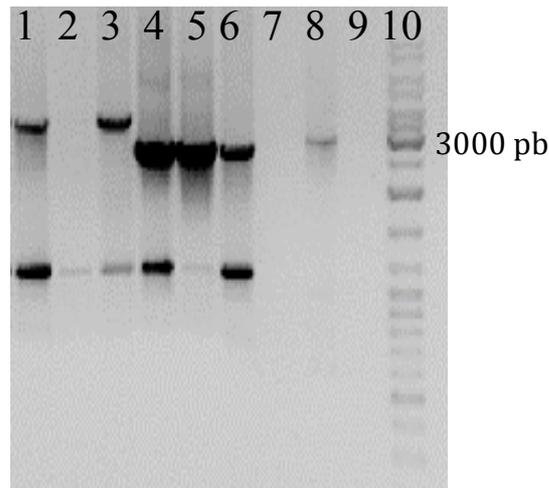
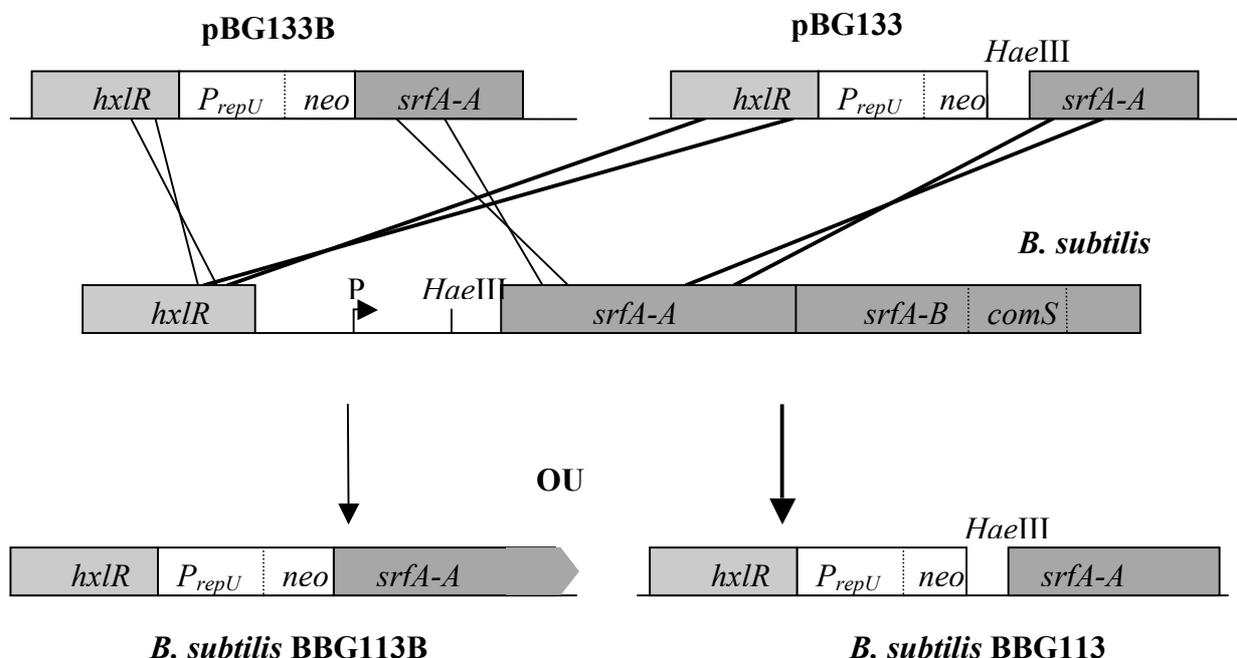


Fig. 55 Vérification de l'insertion du promoteur  $P_{repU,neo}$  en amont du RBS de l'opéron *srfA* chez *B. subtilis* 168 et BBG111. Piste 1 :BBG118B ; Piste 3 : BBG113B ; Piste 5 :BBG111 ; Piste 6 : 168 ; Piste 10 : PM, O'GeneRuler

Les constructions ont été vérifiées par PCR (Fig. 54 et Fig. 55, page 168) avec des amorces *hxlR2* sens et *srfAA2* antisens externes aux plasmides pBG133 et pBG133B utilisés pour la recombinaison (Tableau 6, page 69). Pour tous les transformants, une bande supérieure d'environ 4000 pb peut être observée par comparaison à la bande obtenue avec BBG111 et/ou *B. subtilis* 168 ( $\approx$  3000 pb).



***B. subtilis* BBG113B** ***B. subtilis* BBG113**  
 Fig. 56 Construction des souches BBG113 et BBG113B.  $P_{srfA}$  est remplacé par  $P_{repU}$  grâce à la recombinaison homologue des plasmides pBG133 ou pBG133B avec *B. subtilis* 168 et BBG111. Deux constructions sont détaillées, le remplacement chez BBG113 a été effectué avant le site de restriction *HaeIII* situé en amont de *srfAA*. Le remplacement chez BBG113B a été effectué au niveau du RBS de l'opéron *srfA*.

Les constructions BBG113 et BBG113B ont aussi été vérifiées par séquençage de la séquence  $P_{repU-neo\_srfAA}$  en utilisant les amorces  $P_{repU-neo}$  sens et  $srfAA3$  antisens (Tableau 6, page 69). Le séquençage de cette région a été comparé à la séquence publiée de *B. subtilis* 168 (PubMedGene NC\_000964.2). Celui-ci a révélé 3 erreurs identiques chez les dérivés BBG113 et BBG113B, laissant entrevoir que ces 3 erreurs proviennent de l'ancienne séquence publiée de *B. subtilis* 168, ceci doit être vérifié sur la nouvelle séquence récemment publiée (Zeigler *et al.*, 2008).

#### 4.1.5. Interruption du gène *ppsA* codant pour la synthèse de plipastatine chez les dérivés de *B. subtilis* 168

Enfin, l'opéron *pps* codant pour la synthèse de plipastatine chez *B. subtilis* 168 a été interrompu par une cassette de résistance à la spectinomycine chez les différents mutants obtenus lors des étapes décrites ci-dessus (§ 4.4, page 89). La recombinaison homologue a généré des mutants dérivés de chacune des souches BBG111, BBG113 et BBG113B ne produisant plus de plipastatine, dénommés respectivement BBG130, BBG131 et BBG131B.

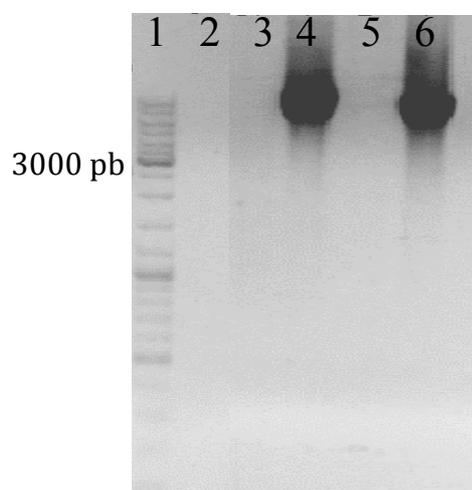


Fig. 57 Vérification de l'interruption du gène *pps* par la cassette de résistance *spc* chez BBG111 et BBG113B.  
Piste 1 : PM, O'GeneRuler ; Piste 4 : BBG130 ; Piste 6 : BBG131B.

Les constructions ont été vérifiées par PCR (Fig. 57, page 169) avec des amorces *spc1* sens et *ppsA2* antisens (Tableau 6, page 69) externes au fragment intégré dans le plasmide pBG149 utilisé pour la recombinaison. Pour tous les transformants, une bande supérieure d'environ 4000 pb peut être observée par comparaison à la bande obtenue avec BBG111 et/ou *B. subtilis* 168.

#### 4.1.6. Interruption du gène *spoIIIA*, impliqué dans la sporulation chez les dérivés de *B. subtilis* 168

Une dernière modification génétique a été entreprise chez certaines des souches décrites ci-dessus. C'est ainsi que chez les souches BBG111 et BBG113B, l'interruption de la sporulation a été effectuée par délétion d'une partie du gène *spoIIIA* et par insertion dans le gène d'une cassette de résistance à la spectinomycine. Ceci afin d'approfondir l'étude de la souche *B. subtilis* BBG113B. La recombinaison homologue a généré des mutants dérivés respectivement de BBG111 et de BBG113B ne sporulant plus, dénommés BBG119 et BBG120 (§ 4.5, page 91).

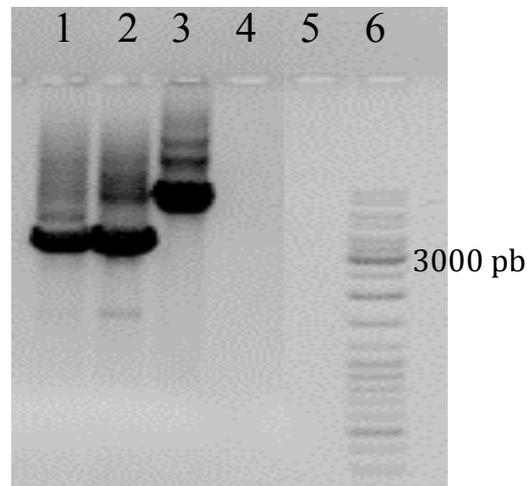


Fig. 58 Vérification de l'interruption du gène *spoIIIA* par la cassette de résistance *spc* chez BBG111 et BBG113B. Piste 1 :BBG119 ; Piste 2 : BBG120 ; Piste 3 : BBG111 ; Piste 6 : PM, O'GeneRuler

Les constructions ont été vérifiées par PCR (Fig. 58, page 170) avec les amorces *accb* sens et *efp* antisens (Tableau 6, page 69) externes au plasmide pBG145 utilisé pour la recombinaison. Pour tous les transformants, une bande d'environ 3600 pb peut être observée par comparaison à la bande obtenue avec BBG111 qui, cette fois-ci, est supérieure puisque cette modification engendre une délétion d'une partie de l'opéron *spoIIIA*.

A l'issue de ces travaux de biologie moléculaire, les objectifs de construction de souches mono-productrices de surfactine ont été atteints (Fig. 59, page 171). Les propriétés phénotypiques telles que l'activité hémolytique, la capacité de colonisation d'un milieu solide, la capacité à sporuler et les activités antibactériennes et antifongiques de la souche *B. subtilis* 168 et de ses différents dérivés ont été étudiées ainsi que la production de lipopeptides, dans différents milieux de culture.

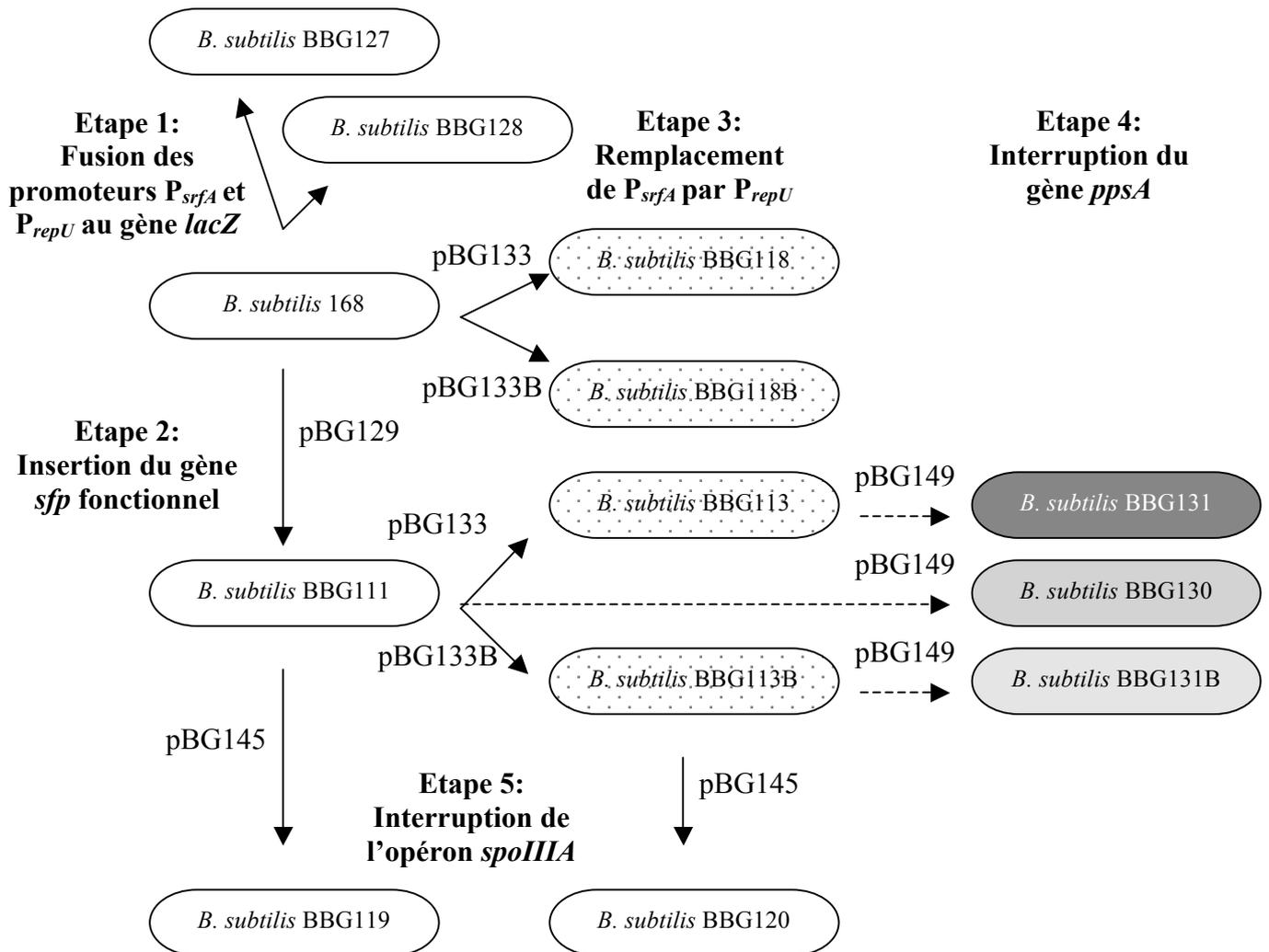


Fig. 59 Représentation de la stratégie mise en œuvre pour les modifications de *B. subtilis* 168. L'étape 3 a été réalisée dans *B. subtilis* 168 et BBG111 à deux positions différentes en amont du premier gène de l'opéron *srfA* grâce à deux outils plasmidiques différents. Les plasmides utilisés pour les recombinaisons homologues sont annotés sur les flèches. L'étape 5 n'a été effectuée que sur BBG111 et BBG113B.

## 4.2. PROPRIETES PHENOTYPIQUES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES DERIVES DE *B. SUBTILIS* 168 SUR MILIEU SOLIDE

### 4.2.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la surfactine et la plipastatine possèdent de nombreuses activités biologiques (§1.4.1.2, page 36 et § 1.4.2.2, page 40). Une modification dans leur synthèse entraîne le plus souvent des modifications importantes sur le phénotype de la souche (Leclère *et al.*, 2005). Les activités directement liées à la production de la surfactine sont hémolytiques et tensioactives. Mais la surfactine peut aussi agir synergiquement avec d'autres lipopeptides comme l'iturine ou la fengycine (Souto *et al.*, 2004; Leclère *et al.*, 2005; Ongena *et al.*, 2005; Ongena *et al.*, 2007; Ongena et Jacques, 2008). Les résultats présentés ci-dessous sont issus des différents tests d'activité biologique entrepris sur les souches dérivées de *B. subtilis* 168. Les capacités d'hémolyse, de colonisation et d'antagonisme des souches obtenues précédemment ont été étudiées.

### 4.2.2. Activités hémolytiques

La surfactine est connue pour être un composé tensioactif très puissant qui possède des activités hémolytiques toutes aussi importantes (Arima *et al.*, 1968; Peypoux *et al.*, 1999; Deleu *et al.*, 1999a). *B. subtilis* 168 et ses dérivés ont été cultivés à 37 °C, selon une méthode standardisée, sur un milieu de Landy gélosé tamponné à pH 7 avec du MOPS 0,1M (Fig. 60, page 173) ou sur un milieu de LB gélosé pH 7 (résultats non présentés), tous deux complétés de sang défibriné de cheval (§10.2, page 117).

Les souches de *B. subtilis* 168, BBG118 et BBG118B ne produisent pas de lipopeptides (Sfp<sup>0</sup>), et ne montrent pas d'activité hémolytique. Par ailleurs les souches BBG119 et BBG120 ont été testées mais ne figurent pas dans ces résultats car elles présentent des profils identiques à ceux de leur souche parentale. Toutes ces souches ne sont donc pas présentées dans ces résultats. Les différences de profil hémolytique entre chaque souche Sfp<sup>+</sup> sont les mêmes en milieu Landy MOPS et en milieu LB (ces derniers ne sont pas présentés), avec toutefois une augmentation de l'hémolyse en milieu de Landy, celui-ci étant plus propice à la production de lipopeptides.

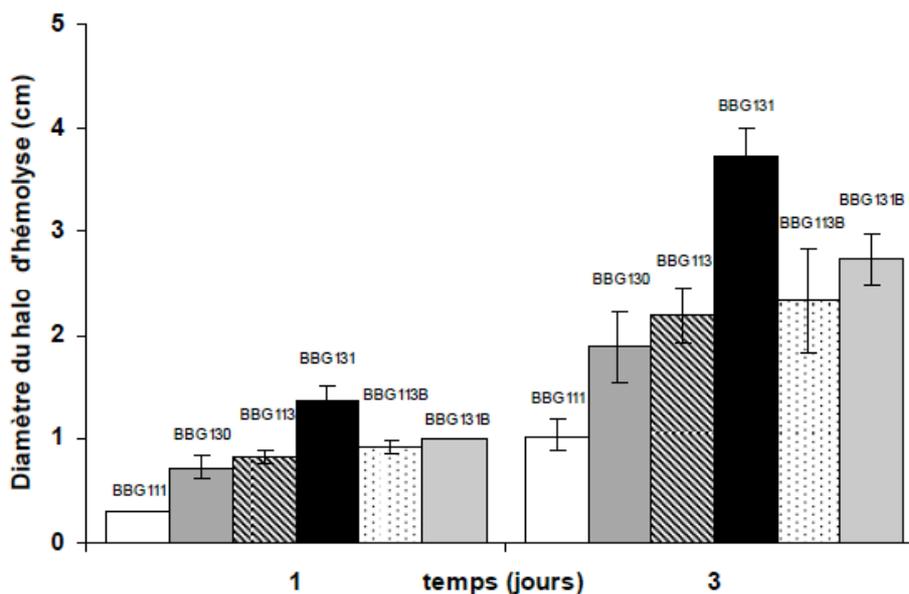


Fig. 60 Activité hémolytique de *B. subtilis* BBG111 et de ses dérivés sur Landy MOPS 0,1M gélosé au sang. Trois microlitres d'une culture de chaque souche en phase exponentielle sont déposés avec une méthode standardisée au centre de la boîte de Petri qui est ensuite incubée pendant 3 jours à 37°C.

Lors de cette expérience, on observe que l'activité hémolytique des souches constitutives BBG113 et BBG113B est plus élevée que celle de BBG111 (Fig. 60, page 173). Un très petit halo est observé autour de la colonie BBG111 après une seule journée. Dans le même temps, avec BBG113B, un diamètre d'hémolyse plus important est observé mais celui-ci semble plus diffus que celui de BBG111 (Fig. 61, page 173). Cette observation est également vérifiée après deux jours de croissance supplémentaires. La plus grande hémolyse est observée sur les deux milieux de culture avec les souches Sfp + produisant de manière constitutive la surfactine, avec un diamètre d'hémolyse maximum de 3,9 cm pour BBG131. En outre, dans tous les cas, l'interruption de la synthèse de plipastatine renforce l'activité hémolytique des souches BBG130, BBG131 et BBG131B (Fig. 60, page 173).

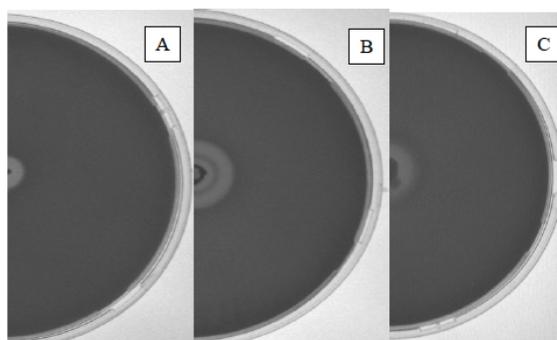


Fig. 61 Photographie du halo hémolytique de *B. subtilis* BBG111 et de ses dérivés sur Landy MOPS 0,1M gélosé au sang après 3 jours d'incubation à 37°C. Les photographies sont réalisées à l'aide de l'appareil GelDoc. A : BBG111 ; B : BBG113 ; C. BBG113B.

Par ailleurs, une différence de colonisation du milieu peut aussi être observée lors de ce test. Les souches constitutives semblent coloniser plus facilement le milieu, ce qui tend à agrandir le diamètre du halo d'hémolyse (Fig. 61, page 173).

#### 4.2.3. Croissance invasive

Les biosurfactants, comme la surfactine, facilitent la croissance invasive grâce à la diminution de la tension de surface du milieu sur lequel ils sont produits (Julkowska *et al.*, 2005; Leclère *et al.*, 2006). Vu les résultats obtenus lors des tests hémolytiques, il devient intéressant d'étudier les capacités de nos souches à coloniser un milieu. Les expériences de colonisation des souches ont été menées avec tous les dérivés de *B. subtilis* obtenus lors de ces travaux. Comme précédemment expliqué (§10.3, page 117), les souches sont déposées au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu B gélosé (0,7% agar) et l'évolution du diamètre de la colonie est suivie pendant 8 jours (Fig. 62, page 174).

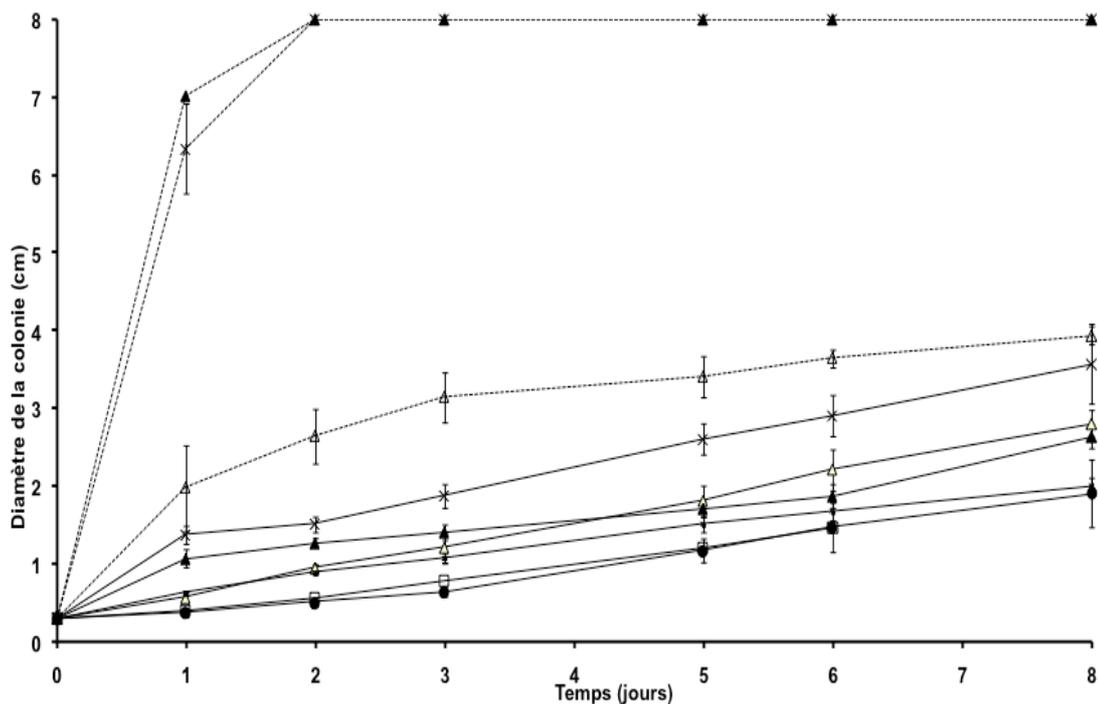


Fig. 62 Etude du comportement invasif de *B. subtilis* 168 et de ses dérivés. Les souches sont déposées en phase exponentielle de croissance au centre de la boîte de milieu B peu gélosé (0,7%) selon une méthode standardisée et incubées 8 jours à 37°C. Le diamètre de la colonie est mesuré au cours du temps. Lignes continues : ● *B. subtilis* 168, △ BBG111, × BBG113, ▲ BBG113B, □ BBG118 et ■ BBG118B. Lignes discontinues pour les dérivés ne produisant plus de plipastatine : △ BBG130, × BBG131 et ▲ BBG131B.

La souche 168, qui ne produit pas de lipopeptides, montre une colonisation restreinte du milieu, tout comme les souches BBG118 et BBG118B. Par contre, la diffusion des lipopeptides et notamment de la surfactine est plus importante chez les souches produisant la surfactine de manière constitutive. Un halo de réfringence, correspondant à un cercle de diffusion de la surfactine est observé entourant la colonie de BBG111 après 3 jours, celui-ci permet de visualiser le front de diffusion des lipopeptides dans le milieu et il facilite la colonisation de la bactérie. Il apparaît après le premier jour chez les souches constitutives. Du reste, le développement de la colonie BBG113 est deux fois plus important que celui de BBG111 après deux jours d'incubation, ce rapport restant constant au cours des jours suivants. En moyenne, la colonisation de la souche BBG113B est plus élevée que celle de BBG111 au cours des cinq premiers jours d'incubation. Les souches BBG130, BBG131 et BBG131B, dans lesquelles la production de plipastatine a été interrompue, présentent une capacité de colonisation de 5 à 8 fois plus forte que celles de leurs souches parentales (BBG111, BBG113 et BBG113B).

#### 4.2.4. Activités antifongiques et antibactériennes

L'activité antibactérienne a été évaluée contre *M. luteus* et *S. aureus* par antagonisme direct sur boîtes de Petri comme décrit dans Matériel et Méthodes (§ 10.4, page 118). Aucune activité antibactérienne n'a été trouvée contre *M. luteus*. Une activité de toutes les souches dérivées de *B. subtilis* 168 peut être observée contre *S. aureus*, BBG113 et BBG113B montrant une activité légèrement meilleure que BBG111; à noter que la responsabilité de la surfactine dans l'inhibition de croissance de *S. aureus* semble faible car la souche *B. subtilis* 168 permet aussi une légère inhibition. Néanmoins, la surfactine doit permettre la diminution de la tension de surface du milieu et la diffusion des autres produits extracellulaires.

Pour déterminer le rôle respectif joué par la surfactine et la plipastatine dans les activités antifongiques des souches BBG111, BBG113 et BBG113B, les activités antagonistes contre *F. oxysporum* ont été comparées *in vitro* à celles obtenues avec leurs dérivés non producteurs de plipastatine, à savoir respectivement BBG130, BBG131 et BBG131B (§10.5, page 119).

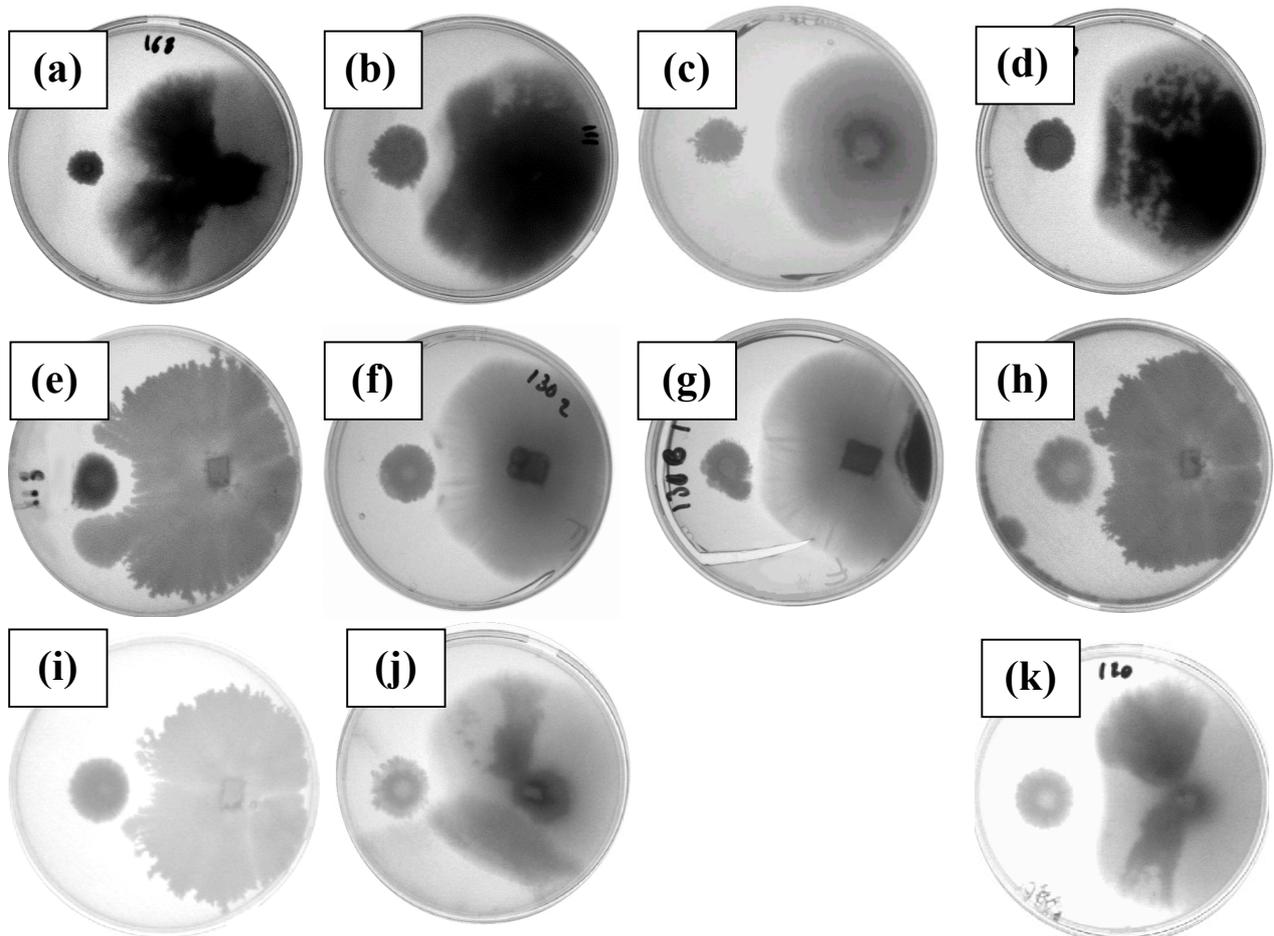


Fig. 63 Photographies de l'activité antifongique des dérivés de *B. subtilis* 168 contre *F. oxysporum*. 5  $\mu$ L de la suspension cellulaire en phase exponentielle sont déposés selon une méthode standardisée (du côté gauche de la boîte) en face de *F. oxysporum* préalablement déposé sur un milieu PDA gélosé (du côté droit de la boîte). Les photographies sont prises après 6 jours d'incubation à 30°C (a) *B. subtilis* 168 (*trpC2*); (b) BBG111 (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*); (c) BBG113 (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *P<sub>repU-neo</sub>::HaeIII-srfA*); (d) BBG113B (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *P<sub>repU-neo</sub>::srfA*); (e) BBG118 (*trpC2*, *P<sub>repU-neo</sub>::HaeIII-srfA*); (f) BBG130 (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *ppsA::spc*); (g) BBG131 (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *P<sub>repU-neo</sub>::HaeIII-srfA*, *ppsA::spc*); (h) BBG131B (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *P<sub>repU-neo</sub>::srfA*, *ppsA::spc*); (i) BBG118B (*trpC2*, *P<sub>repU-neo</sub>::srfA*); (j) BBG119 (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *spoIIIA::spc*); (k) BBG120 (*trpC2*, *amyE::sfp-cat*, *P<sub>repU-neo</sub>::srfA*, *spoIIIA::spc*).

Un petit effet d'inhibition de la croissance de *F. oxysporum* peut être observé avec les souches non productrices de lipopeptides *B. subtilis* 168 (a) et BBG118 (e), probablement en raison de la concurrence pour le substrat ou suite à une modification du pH (Fig. 63, page 176).

Cet effet est légèrement amélioré quand un niveau élevé de surfactine est atteint, comme chez BBG111 (b) et BBG130 (f). Toutefois, une importante et reproductible activité antifongique est observée lorsque les surfactine synthétases sont contrôlées par le promoteur constitutif ; c'est le cas pour BBG113 (c) et BBG113B (d) avec une légère accentuation pour la souche BBG120 (k). Cet effet disparaît lorsque l'opéron codant pour la synthèse de plipastatine est interrompu chez BBG131 (g) et BBG131B (h).

### 4.3. PRODUCTION DE LIPOPEPTIDES ET COMPORTEMENT DES DERIVES DE *B. SUBTILIS* 168 EN MILIEU LIQUIDE

#### 4.3.1. Introduction

Dans les travaux qui suivent, la production et la quantification des lipopeptides de *B. subtilis* sont effectuées en fiole d'Erlenmeyer. De nombreuses expériences sont rapportées dans la littérature sur l'effet des conditions de culture sur la production de lipopeptides, et notamment sur les surfactines. Dans nos travaux, l'intérêt a été porté sur le milieu de Landy, qui est le milieu de référence pour la production des lipopeptides de *B. subtilis*. Les souches précédemment construites ont donc été cultivées dans ce milieu, tamponné ou non par du MOPS 0,1M ; l'effet du contrôle du pH sur la production de lipopeptides pouvant être ainsi évalué. Des cultures en milieu B liquide ont aussi été entreprises afin de les comparer à celles réalisées en milieu solide.

Les croissances et les productions de surfactine et de plipastatine, de nos dérivés Sfp<sup>+</sup> de *B. subtilis* 168 dans ces différents milieux, seront présentées dans ce chapitre, ainsi qu'une étude de la capacité des souches à sporuler en milieu liquide. Par ailleurs, afin de pouvoir différencier les souches, une étude de la production spécifique en milieu Landy MOPS sera menée. Ce travail préliminaire doit déterminer l'intérêt de l'utilisation préférentielle d'une de nos souches en prévision du développement d'applications pouvant faire suite à cette étude.

#### 4.3.2. La croissance en milieu liquide

Les croissances des différentes souches ont été réalisées dans du milieu de Landy tamponné ou non et dans du milieu B. Ne seront présentées dans ce chapitre que celles effectuées dans du milieu de Landy tamponné avec 0,1 M de MOPS (§ 5.3, page 93).

Des études préliminaires réalisées au laboratoire ont montré l'intérêt de l'utilisation du MOPS pour contrôler les variations de pH lors de la production de lipopeptides par *B. subtilis*. Les cultures sont réalisées dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de culture et incubées à 37°C et 130 tpm d'agitation pendant 48 h. (Fig. 64, page 178). Il est à noter que les niveaux de croissance dans le milieu B sont assez faibles en raison de la faible concentration en sources carbonées présentes dans ce milieu. Toutes les souches dans le milieu Landy MOPS présentent des croissances quasi identiques durant les 9 premières heures de culture, ce qui correspond à la phase de croissance exponentielle, atteignant un maximum de 8 uDO pour la souche BBG113B. Par contre la suite de la croissance est assez différente en fonction des modifications apportées aux souches. En effet, trois profils de croissance se distinguent les uns des autres.

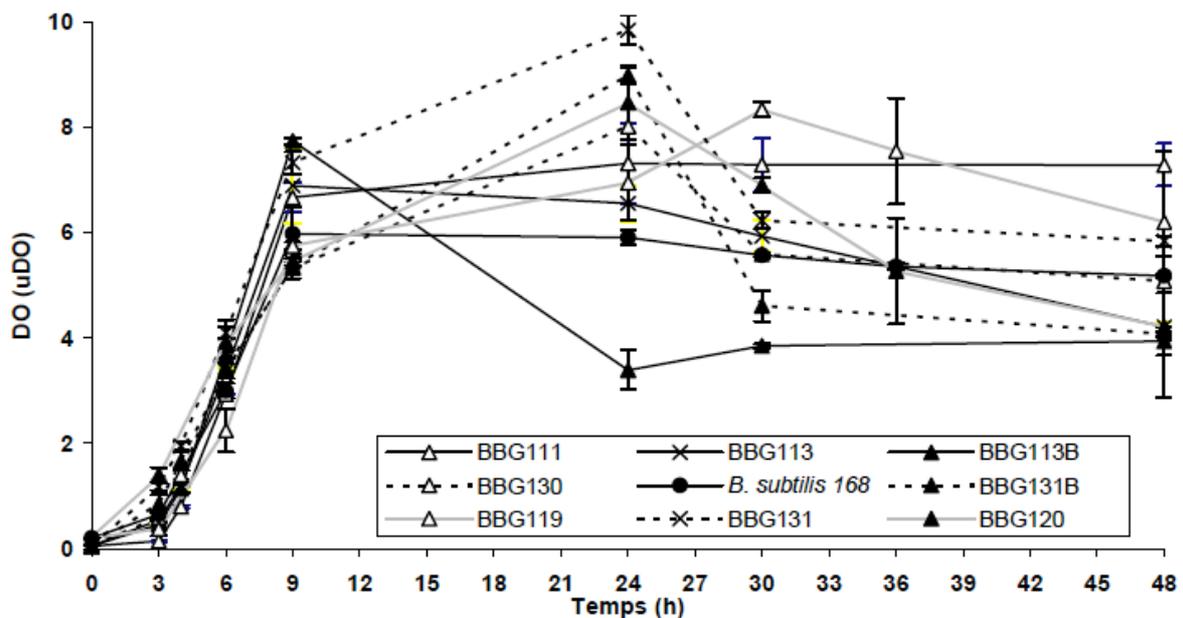


Fig. 64 Cinétiques de croissance de *B. subtilis* 168 et de ses dérivés pendant une culture dans du milieu Landy MOPS 0,1M à 37°C et 130 tpm d'agitation. L'expérience a été réalisée en trois exemplaires. La densité optique à 600nm est mesurée à intervalles de temps réguliers. Lignes continues : ● *B. subtilis* 168, △BBG111, × BBG113, ▲ BBG113B, □ BBG118 et ■ BBG118B. Lignes discontinues pour les dérivés ne produisant plus de plipastatine : △BBG130, × BBG131 et ▲ BBG131B. Lignes de point pour les dérivés ne sporulant plus : △BBG119, ▲ BBG120.

Les souches *B. subtilis* 168 et BBG111 présentent une croissance similaire ayant atteint son maximum après la fin de la phase de croissance exponentielle. Ce qui n'est pas le cas des souches dans lesquelles la synthèse de plipastatine ou la sporulation a été interrompue, puisqu'une phase de croissance linéaire peut être observée après 9 h de culture, permettant d'obtenir un pic de croissance se situant entre 8 et 10 uDO à 24 h ou 30 h de culture (BBG130, BBG131, BBG131B et BBG119, BBG120).

En revanche, l'évolution de croissance la plus spectaculaire est celle obtenue avec les souches dérivées de BBG111 qui expriment de manière constitutive l'opéron *surfA* (BBG113 et BBG113B). En effet, une importante décroissance peut être observée après la fin de la phase exponentielle de croissance ; ce résultat est d'ailleurs très marqué chez la souche BBG113B. Ceci peut être le résultat soit d'un phénomène de sporulation, soit d'un épuisement rapide du milieu dû à la synthèse précoce de surfactine combinée à la synthèse de plipastatine.

#### 4.3.3. La production de lipopeptides en milieu liquide

Les productions ont été effectuées dans du milieu de Landy tamponné ou non avec 0,1 M de MOPS et dans du milieu B. Les cultures sont réalisées dans des fioles Erlenmeyer contenant 100 mL de culture et incubées à 37°C et 130 tpm d'agitation pendant 48 h (§ 5.3, page 93). La présence de lipopeptides a été analysée tout d'abord par CCM, puis a été quantifiée par CLHP après pré-purification des surnageants de culture sur une colonne C18 (§ 9.4, page 112). L'analyse des résultats obtenus par CCM révèle une tache importante correspondant à la surfactine ( $R_f = 0,8$ ) chez toutes les souches sauf pour les souches BBG113B et BBG120 où une toute petite tache est difficilement observable (résultats non présentés).

Les analyses en CLHP révèlent un niveau de production de surfactine différent pour chaque souche modifiée et cette différence se retrouve dans l'ensemble des milieux testés (Tableau 17, page 180; Fig. 65, page 181). Dans le milieu B qui contient très peu de substrat carboné, la production de lipopeptides est très faible, probablement en raison de cette limitation en source de carbone. Une très faible production de surfactine est observée chez BBG113B, limitée à environ 44 mg/L (Tableau 17, page 180) ; néanmoins une augmentation de la production de plipastatine atteignant 40 mg/L est observée avec cette souche (Tableau 18, page 180). D'importantes productions de surfactine sont observées avec BBG111 et BBG113 après 48 h d'incubation dans du milieu Landy MOPS, elles ont atteint respectivement 1,5 et 1,2 g/L.

Tableau 17 Production de surfactine (mg/L) chez BBG111 et ses dérivés dans différents milieux à 37°C\*.

Souches	Temps		Milieu Landy	
	(h)	Milieu de Landy	Milieu B	MOPS
BBG111	24	590 (SD = 14,9)	90 (SD = 7,1)	1768 (SD = 31,1)
	48	1136 (SD = 13,6)	214 (SD = 14,7)	1504 (SD = 67,9)
BBG130	24	1066 (SD = 11,3)	ND	1833 (SD = 51,0)
	48	1103 (SD = 45,1)	ND	1423 (SD = 164,1)
BBG113	24	757 (SD = 102,3)	178 (SD = 34,1)	1155 (SD = 105,7)
	48	782 (SD = 119,2)	312 (SD = 24,6)	1213 (SD = 51,8)
BBG131	24	693 (SD = 54,8)	ND	1092 (SD = 8,0)
	48	860 (SD = 64,9)	ND	1540 (SD = 38,2)
BBG113B	24	14 (SD = 7,7)	7 (SD = 1,5)	25 (SD = 15,2)
	48	8 (SD = 3,3)	15 (SD = 8,0)	44 (SD = 16,0)
BBG131B	24	16 (SD = 9,3)	ND	30 (SD = 5,4)
	48	23 (SD = 5,4)	ND	70 (SD = 11,1)
BBG119	24	1400 (SD = 120,1)	80 (SD = 10,1)	1800 (SD = 98,3)
	48	1200 (SD = 130,1)	70 (SD = 15, 2)	1350 (SD = 36,7)
BBG120	24	2 (SD = 2,1)	0	23,4 (SD = 10,1)
	48	4 (SD = 3,6)	0	4 (SD = 2,2)

\*Les valeurs sont issues de la répétition de trois expériences  
SD : Déviation Standard.

Tableau 18 Production de plipastatine (mg/L) par BBG111 et ses dérivés dans différents milieux à 37°C\*.

Souches	Temps		Milieu	
	(h)	Milieu de Landy	Milieu B	Landy MOPS
BBG111	24	25 (SD = 11,2)	0	32 (SD = 10,0)
	48	15 (SD = 6,2)	0	25 (SD = 14,8)
BBG113	24	31 (SD = 6,7)	0	44 (SD = 5,0)
	48	26 (SD = 4,1)	0	37(SD = 5,0)
BBG113B	24	36 (SD = 1,8)	0	47 (SD = 17,0)
	48	26 (SD = 7,3)	0	40 (SD = 7,0)

\*Les valeurs sont issues de la répétition de trois expériences  
SD : Déviation Standard.

Comme attendu, les souches BBG130, BBG131 et BBG131B ne synthétisent pas de plipastatine, mais après 24 ou 48 h de culture, selon les cas, le rendement de production de la surfactine est légèrement plus élevé dans les souches BBG130 et BBG131 par rapport à leurs souches parentales (Tableau 19, page 182). Par ailleurs, l'interruption de la sporulation chez BBG111 semble augmenter de manière significative la production de surfactine en milieu Landy tamponné ou non, ce qui n'est pas le cas pour le dérivé Spo<sup>-</sup> de BBG113B.

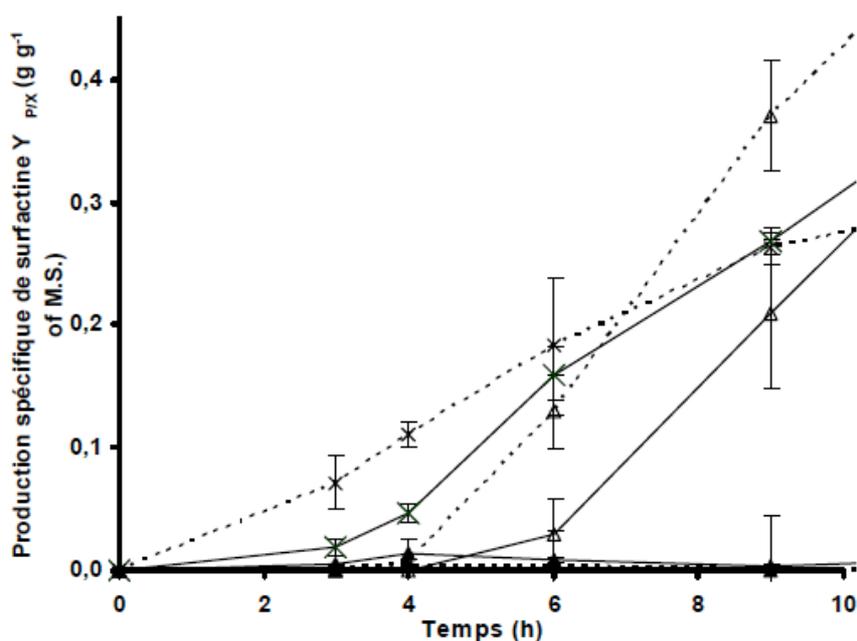


Fig. 65 Production spécifique de surfactine par *B. subtilis* BBG111 et ses souches dérivées durant les premières heures de croissance en milieu Landy MOPS à 37°C sous 130 tpm d'agitation. La production de surfactine est quantifiée par HPLC à partir des surnageants purifiés prélevés à intervalles de temps réguliers. La production est ramenée à la quantité de biomasse. Lignes continues :  $\triangle$  BBG111,  $\times$  BBG113 et  $\blacktriangle$  BBG113B, Lignes discontinues pour les dérivés ne produisant plus de plipastatine :  $\triangle$  BBG130,  $\times$  BBG131 et  $\blacktriangle$  BBG131B.

La cinétique de production spécifique de la surfactine de la souche BBG111, de ses dérivés constitutifs, ainsi que leurs dérivés ne produisant plus de plipastatine, est analysée en milieu Landy MOPS au cours de la phase de croissance exponentielle qui se termine après 9 h de culture (Fig. 65, page 181). Cette étude montre que la biosynthèse de lipopeptides commence très tôt chez toutes les souches constitutives. Après 6 h de culture, une production spécifique de surfactine 5 fois supérieure peut être observée chez la souche constitutive BBG113 par rapport à BBG111; cette production spécifique demeure supérieure durant les 12 premières heures de culture. Toutefois, la production spécifique reste limitée à environ 0,03 g/g de M.S. pour BBG113B et BBG131B (Fig. 65, page 181).

Le remplacement du promoteur natif par un promoteur constitutif semble largement réduire la production spécifique de surfactine après 6 h de croissance dans le cas de BBG113B mais pas pour BBG113. La comparaison des productions spécifiques de chacune de ces souches est présentée ci-dessous (Tableau 19, page 182). Celle-ci montre que les souches ne produisant plus de plipastatine, à savoir BBG130 et BBG131, sont les plus performantes avec respectivement 1,67 et 1,47 ± 0,2 g de surfactine produits par g de biomasse. Il devient dès lors intéressant d'utiliser ces souches dans le procédé intégré de production continue développé précédemment (§ 3, page 149).

Tableau 19 Productions spécifiques de surfactine et de plipastatine ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of M.S.) lors de cultures en milieu Landy MOPS\*

Souches	Temps (h)	Surfactine	Plipastatine
<b>BBG111</b>	24	1,08 (SD = 0,07)	0,02 (SD = 0,01)
	48	0,87 (SD = 0,16)	0,01 (SD = 0,01)
<b>BBG130</b>	24	1,23 (SD = 0,03)	-
	48	1,67 (SD = 0,20)	-
<b>BBG113</b>	24	0,88 (SD = 0,21)	0,03 (SD = 0,01)
	48	0,97 (SD = 0,03)	0,03 (SD = 0,01)
<b>BBG131</b>	24	0,67 (SD = 0,01)	-
	48	1,47 (SD = 0,16)	-
<b>BBG113B</b>	24	0,03 (SD = 0,02)	0,05 (SD = 0,02)
	48	0,03 (SD = 0,02)	0,03 (SD = 0,01)
<b>BBG131B</b>	24	0,01 (SD = 0,00)	-
	48	0,03 (SD = 0,01)	-

\*Les valeurs sont issues de la répétition de trois expériences  
SD : Déviation Standard.

#### 4.4. INFLUENCE DE L'EXPRESSION CONSTITUTIVE DE *SRFA* CHEZ BBG113B SUR LA SPORULATION DE LA SOUCHE.

Lors de nos recherches il a semblé important de trouver une explication à la très faible production de surfactine de la souche BBG113B en milieu liquide, qui ne coïncide pas avec les fortes activités biologiques observées en milieu solide. Bien que la suppression de l'opéron *spoIIIA* n'ait pas engendré une augmentation de la production de surfactine chez la souche BBG120, la décroissance rapide de la turbidité observée chez BBG113B mérite qu'un test de sporulation soit effectué.

Comme nous l'avons précédemment démontré ce test repose sur un stress nutritif de la souche (§ 9.2, page 111). L'effet de l'expression constitutive de *srfa* sur la sporulation a été testé chez certains dérivés de *B. subtilis* 168. Les souches ont été cultivées dans un milieu riche jusqu'à ce qu'elles atteignent le milieu de la phase exponentielle de croissance puis elles ont alors été transférées dans un milieu pauvre. La mesure du taux de sporulation a été effectuée chez *B. subtilis* 168, BBG111, BBG113B, BBG118B, BBG119 et BBG120 à différents intervalles de temps (Fig. 66, page 183).

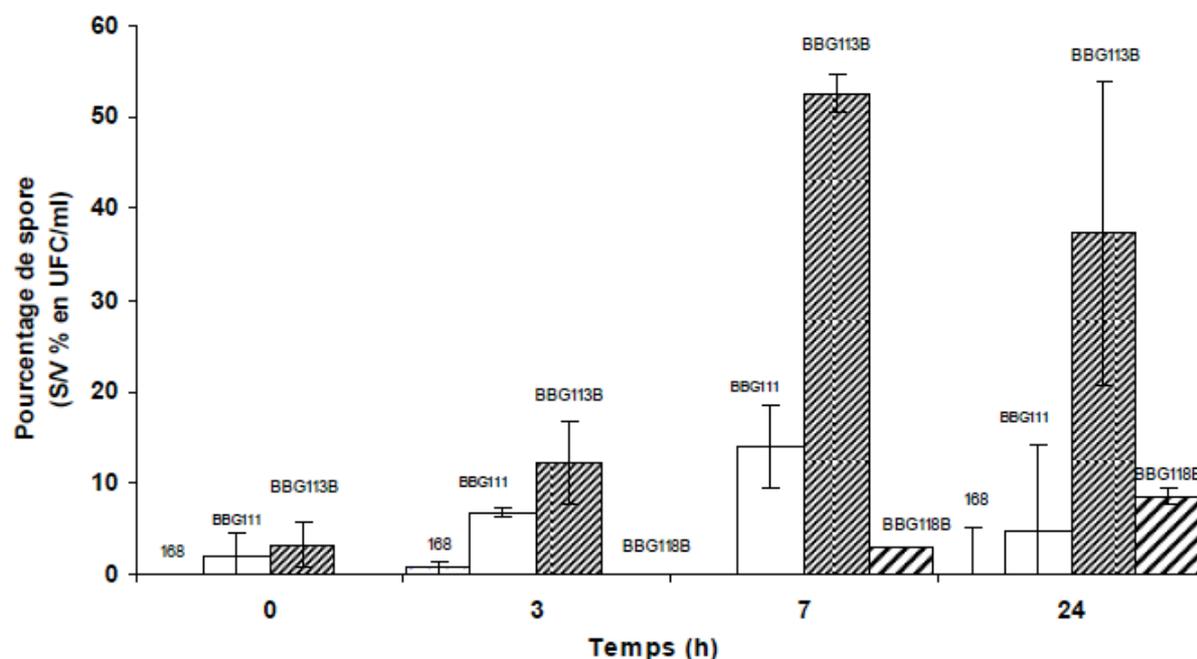


Fig. 66 Effet de l'expression constitutive de l'opéron *srfa* dans la sporulation de *B. subtilis* 168. La cinétique du taux de formation de spores est réalisée à 37°C sous 130 tpm d'agitation dans le milieu de Sterlini-Mandelstam.  $T_0$  représente le temps où les cellules ont été transférées dans le milieu pauvre. De gauche à droite sont représentés *B. subtilis* 168, BBG111, BBG113B et BBG118B. Les résultats sont issus de trois expériences.

Comme attendu les souches BBG119 et BBG120 sont incapables de sporuler et la souche *B. subtilis* 168 sporule très peu. De même, l'insertion du promoteur  $P_{repU}$  juste en amont de l'opéron *srfA* semble ne pas augmenter la sporulation de *B. subtilis* 168 de façon importante (BBG118B). C'est après 7 h de culture dans le milieu pauvre que le taux de sporulation de BBG113B devient très élevé en comparaison de celui de BBG111. Ce résultat peut peut-être expliquer la diminution de la turbidité observée au cours de l'expérience de production de lipopeptides. Il semble que la dérégulation de l'opéron *srfA* chez la souche BBG113B renforce le phénomène de sporulation lorsque la souche subit un stress nutritif.

#### 4.5. CONCLUSION

L'objectif de départ d'obtenir une souche mono-productrice de surfactine, la produisant de manière constitutive, a été atteint. De plus, les différentes expériences réalisées en milieu solide et en milieu liquide et la comparaison de BBG113B à sa variante BBG113 nous ont permis d'avancer dans la compréhension des phénomènes engendrés par l'expression constitutive de l'opéron *srfA*.

Le comportement de la souche BBG113B apparaît comme très différent par rapport à BBG111 mais aussi à BBG113. Même si l'hypothèse la plus probable semble être la présence ou non de la séquence de 140 pb située en amont de l'opéron *srfA*, l'origine du blocage de la synthèse de surfactine reste encore à déterminer. Cette séquence a-t-elle un rôle dans l'expression de l'opéron *srfA*, puisque sa présence permet à la souche BBG113 une bonne expression de celui-ci, mesurée grâce à la production de surfactine en milieu liquide ? Pour tenter de répondre à cette question et quantifier le niveau d'expression de *srfA* chez ces souches, une étude de l'expression de certains gènes a été menée.

## 4.6. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES DEPENDANTS DE LA TRANSCRIPTION DE L'OPERON *SRFA*

### 4.6.1. Introduction

Parallèlement à l'étude du niveau d'expression des gènes dépendant de la transcription de l'opéron *srfA* chez les souches constitutives BBG113 et BBG113B, une analyse comparative de la préparation d'ARN chez *B. subtilis* 168 et ATCC 6633 a été réalisée avec le Dr. Jean-Sébastien Guez, membre du laboratoire ProBioGEM et en collaboration avec la plate-forme de génomique fonctionnelle de l'Université de Lille 2, dirigée par le Pr. Pierre-Marie Danzé. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en relief l'impact de l'origine et de l'âge de la culture sur le rendement d'extraction d'ARN. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Annexe III) mais ceux-ci s'éloignant de notre sujet, ils ne seront pas détaillés ici ; néanmoins la technique optimisée pour l'extraction d'ARN chez les souches de *B. subtilis* est reprise dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 3.3.2, page 70). Ce protocole a alors été utilisé dans nos travaux sur *B. subtilis* 168 afin d'isoler les ARN de nos souches constitutives permettant ainsi de mesurer et de comparer l'expression des gènes liés à la biosynthèse de la surfactine ou à l'expression de *comS* (§ 1.4.1.1, page 30).

### 4.6.2. Analyse par PCR quantitative des gènes régulés par l'expression constitutive de l'opéron *srfA*

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, l'opéron *srfA* est impliqué dans l'expression de nombreux gènes comportementaux de la cellule (§ 1.4.1.1.2, page 34). Pour identifier les gènes potentiellement impliqués dans les activités biologiques, le phénotype et le comportement des souches, comme par exemple la capacité de colonisation, nous avons comparé les profils d'expression de cinq gènes importants situés en amont (Hayashi *et al.*, 2006) et en aval (*srfA-A*, *comS*, *comK* et *abrB*) de la régulation de l'opéron *srfA* dans la souche BBG111 et dans les souches BBG113 et BBG113B, chez lesquelles ce dernier est constitutivement exprimé.

Les souches ont été cultivées dans les conditions de production des lipopeptides, des échantillons sont prélevés au cours du temps en fonction du nombre de générations et le transcriptome a été bloqué. L'extraction des ARN a alors été réalisée. Ceux-ci ont été rétrotranscrits et l'expression des gènes a été quantifiée (§3.3.4, page 72).

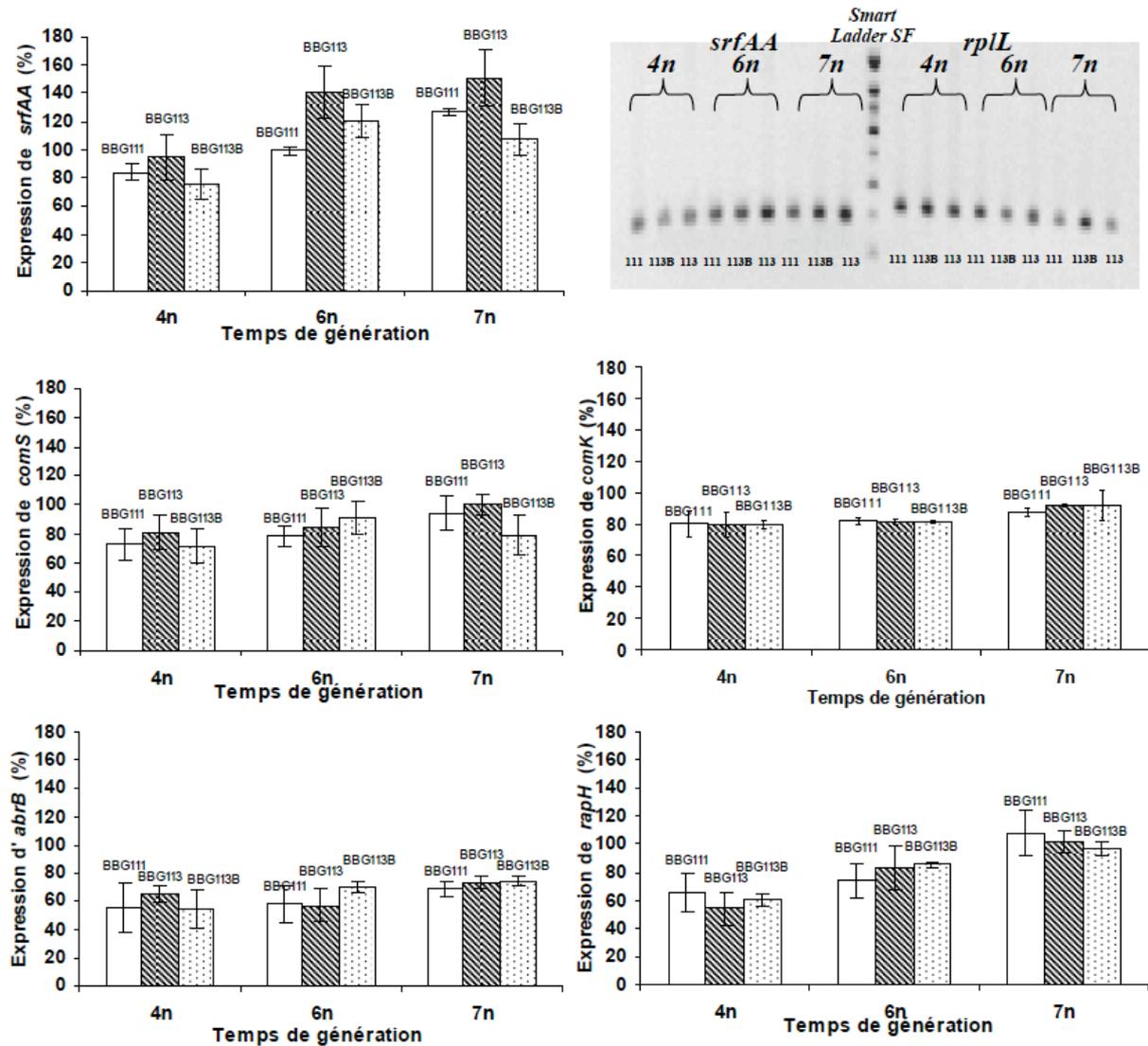


Fig. 67 Effet de l'expression constitutive de l'opéron *srfA* sur l'expression des gènes *srfAA*, *comS*, *comK*, *rapH* et *abrB* chez *B. subtilis* BBG111 et ses dérivés dans des conditions de production de lipopeptides. Le gel d'électrophorèse des RT-PCR comparatives de *srfAA* et *rplL* est présenté pour exemple. Le rapport d'intensité normalisé par *rplL* est présenté pour les gènes *srfAA*, *comS*, *comK*, *rapH* et *abrB* à différents temps de génération, 4, 6 et 7n.

Contrairement aux résultats de Nakano *et al.*, (1991), les résultats présentés ne révèlent pas de différences très significatives du niveau d'expression de *srfA* entre BBG113B, BBG113 et BBG111. Il en est de même pour les autres gènes testés (Fig. 67, page 186).

## 4.7. DISCUSSION

La régulation de l'opéron *surfA* est complexe et impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, dépendantes notamment du quorum-sensing (Cosby *et al.*, 1998). Dans cette étude, nous avons remplacé le promoteur natif  $P_{surfA}$  de *B. subtilis* 168 par le promoteur constitutif  $P_{repU}$  dans le but de libérer l'opéron codant pour la surfactine de sa régulation naturelle. En outre, la synthèse de la plipastatine a été bloquée par l'interruption du gène *ppsA*. Ces modifications génétiques ont permis l'obtention d'une souche monoproductrice de surfactine qui pourra par la suite être utilisée dans nos procédés de production. Par ailleurs, l'observation des souches mutantes nous a permis de révéler les activités synergiques et antagonistes de la surfactine et de la plipastatine.

D'une part, la production de surfactine, l'activité hémolytique et la croissance invasive de la souche ont été fortement augmentées lorsque la synthèse de plipastatine a été interrompue. Ceci demeure un résultat très intéressant et plusieurs hypothèses peuvent permettre d'expliquer ces résultats. Tout d'abord, les biosynthèses de la surfactine et de la plipastatine utilisent de nombreux précurseurs communs comme les chaînes d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés, ou l'acide glutamique. En outre, les deux NRPS impliquées dans la biosynthèse de ces deux lipopeptides doivent être transformées d'apo-enzyme en holo-enzyme par addition d'un même cofacteur. Comme nous l'avons vu précédemment, cette addition est effectuée par la phosphopantéthéine-transférase, qui est codée par le gène *sfp* (§1.2.3, page 21).

Le blocage de l'opéron plipastatine permet peut-être de réorienter ces précurseurs de synthèse et/ou l'activité de la phosphopantéthéine transférase sur la seule synthèse de la surfactine.

D'autre part, la production précoce de la surfactine liée à la production de la plipastatine semble renforcer l'activité antifongique de la souche (Fig. 63, page 176). Un effet de synergie entre les lipopeptides a déjà été clairement démontré pour la surfactine et l'iturine (Thimon *et al.*, 1992), mais n'a jamais été évoqué pour la surfactine et la plipastatine.

Il est également possible que la production précoce de la surfactine permette une meilleure diffusion de la plipastatine dans le milieu par une diminution de la tension de surface, ce qui amplifie donc l'activité antifongique de la souche. La synthèse constitutive de surfactine permet donc une augmentation de la production spécifique de surfactine et l'amélioration de ces propriétés antagonistes.

Deux remplacements de  $P_{srfA}$  ont été effectués dans un dérivé  $Sfp^+$  de *B. subtilis* 168, qui a été prouvé comme étant auto-résistant à la surfactine (Tsuge *et al.*, 2001b). Le premier remplacement, dans la souche BBG113 a été réalisé au niveau du site de restriction *HaeIII*, situé à 140 pb en amont du premier ORF de l'opéron *srfA*.

Le second, chez BBG113B a été effectué juste avant le premier gène (*srfA-A*) de l'opéron *srfA*, afin de vérifier l'hypothèse formulée précédemment (Nakano *et al.*, 1991).

Dans le cas de la souche BBG113 comparée à sa souche parentale BBG111, l'expression constitutive de *srfA* a permis d'augmenter 5 fois la production spécifique de la surfactine au cours de la phase exponentielle de croissance (Fig. 65, page 181). Dans le cas de la souche BBG113B, la production spécifique de la surfactine a été environ 50 fois moins importante que celle de la souche BBG111, même si l'expression d'un gène dépendant du promoteur  $P_{repU}$  est nettement plus élevée au début de la croissance, comme nous l'avons montré avec l'expérience de fusion au gène *lacZ* (Fig. 53, page 166). La biosynthèse de la surfactine reste rapidement limitée à une concentration de 35 mg/L chez la souche BBG113B. En outre, la quantification des lipopeptides dans le culot cellulaire n'a pas montré la présence de fortes concentrations intracellulaires de surfactine (données non présentées), ceci révoquant l'hypothèse d'un problème de sécrétion.

Selon Nakano et ses collaborateurs (1991), la construction réalisée dans BBG113B conduirait à une transcription plus faible de l'opéron *srfA*. La séquence nucléotidique située entre le site de restriction *HaeIII* et le site de fixation du ribosome jouerait un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle ou dans le processus de stabilité de l'ARNm de l'opéron *srfA*. En outre, dans de récentes études, les auteurs ont montré que l'extrémité 5' est le principal déterminant de la demi-vie des ARNm (Condon, 2003; Oussenko *et al.*, 2005). Cependant les analyses, après 4 à 7 générations, de l'expression des gènes dépendant de la transcription de l'opéron *srfA* réalisées dans ce travail par RT-PCR, ne montrent pas de différences très significatives entre BBG113 et BBG113B. Les résultats de Nakano étaient obtenus à partir de fusion *LacZ*. L'absence de corrélation observée ici entre, d'une part, les niveaux d'expression similaires des gènes *srfA* et *comS* chez les souches BBG113 et BBG113B et, d'autre part, les différences de productivité de surfactine entre les deux souches tend à montrer qu'il s'agirait plutôt ici d'une régulation post-transcriptionnelle.

Une autre modification du phénotype entre ces deux souches est la forte décroissance de la densité optique de BBG113B observée après la phase de croissance exponentielle au cours d'une culture en milieu liquide. Cette décroissance pourrait résulter d'une accélération de la sporulation qui pourrait rapidement bloquer la synthèse de surfactine. Les résultats obtenus avec des mutants de sporulation ne nous ont cependant pas permis de confirmer cette hypothèse. En effet le dérivé non-sporulant BBG120 obtenu à partir de BBG113B n'a pas récupéré sa capacité de synthèse de quantités importantes de surfactine. Ceci peut toutefois s'expliquer par le fait que l'interruption de la sporulation provoquée ici n'arrive qu'en phase III du phénomène, il empêche la formation de la préspore mais n'empêche pas le démarrage du processus de sporulation (Illing et Errington, 1990).

L'ensemble de ces résultats nous permettent d'entrevoir de nombreuses pistes pour améliorer la compréhension du rôle joué par la région nucléotidique « *HaeIII*-RBS » dans l'expression de *surfA* et le comportement physiologique de la souche. Celles-ci dépassent le cadre de ce travail. C'est pourquoi elles n'ont pas pour le moment été approfondies.

Par ailleurs, l'importante décroissance observée chez BBG113B lors de la culture en milieu liquide (Fig. 64, page 178) et l'effet de l'expression constitutive de l'opéron *surfA* dans la sporulation de *B. subtilis* (Fig. 66, page 183) tend à prouver l'existence d'une relation entre les deux phénomènes. Toutefois celle-ci ne semble pas être responsable de la non-production de surfactine à proprement parler puisque le dérivé BBG120 ne sporule plus et ne produit pas plus de surfactine que sa souche parentale BBG113B. Ceci peut s'expliquer par le fait que l'interruption de la sporulation n'arrive qu'en phase III du phénomène, il empêche la formation de la préspore mais n'empêche pas le démarrage du processus de sporulation (Illing et Errington, 1990).

Par ailleurs, le comportement des souches est différent selon que le milieu est solide ou liquide. La production précoce de la surfactine, même en faible quantité, comme dans le cas de BBG113B, donne à la souche un net avantage pour la colonisation sur milieu solide. En effet, ce faible niveau de production de la surfactine, qui semble être proche de la concentration micellaire critique du biosurfactant (entre 19,5 à 83,6  $\mu\text{M}$  en fonction de la longueur de la chaîne d'acides gras (Deleu *et al.*, 2003), est suffisant pour réduire la tension de surface et pour permettre le comportement invasif de la souche.

Nous l'avons démontré dans nos travaux grâce au test de colonisation de milieu, mais aussi au test hémolytique. Précédemment, des auteurs ont aussi montré que la CMC de la surfactine peut être corrélée à la concentration nécessaire pour obtenir 50% d'hémolyse (Deleu *et al.*, 2003). L'activité hémolytique plus diffuse détectée autour de la colonie de BBG113B, par rapport à BBG111, semble indiquer que la concentration de la surfactine est dans ce cas probablement proche de celle de la CMC (Fig. 62, page 174 et Fig. 65, page 181).

Les souches BGG118 et BBG118B sont des souches capables de surexprimer *srfa-A* et donc *comS*, mais sont incapables ( $Sfp^0$ ) de synthétiser des lipopeptides. Comparées à BBG113 et BBG113B, leur faible capacité de colonisation souligne le rôle mineur joué par *comS* dans ce phénomène par rapport à la production précoce de la surfactine (Fig. 62, page 174), comme cela a également été montré dans une étude très récente (Hamze *et al.*, 2009). Par contre, le remplacement du promoteur  $P_{srfa}$  a peut-être pour conséquence l'accumulation dans les cellules, d'autres facteurs de régulation de l'expression de l'opéron *srfa*, en raison de la disparition de leurs cibles, dont certains semblent être impliqués dans la capacité de colonisation de *B. subtilis* 168 (Hamze *et al.*, 2009).

La comparaison des productions de surfactine et de plipastatine chez nos différentes souches dans des milieux de culture différents, montre une forte variabilité en fonction des conditions de culture. La plus grande production de lipopeptides est observée dans le milieu Landy MOPS, pour la surfactine avec BBG111 et BBG119 (1,5 et 1,8 g/L) et pour la plipastatine avec BBG113 (44 mg/L), soulignant l'importance dans le contrôle du pH (Tableau 17 et Tableau 18, page 180). Cela avait déjà été clairement démontré pour la biosynthèse de la surfactine au niveau transcriptionnel (Cosby *et al.*, 1998), mais n'avait jamais été évoqué pour la biosynthèse de la plipastatine. Fait intéressant, le contrôle du pH a également un effet positif sur la production de la surfactine chez BBG113 qui est indépendante du quorum-sensing. Ce dernier résultat semble indiquer que la transcription n'est pas le seul mécanisme influencé par le pH. Peu de différences dans les productions spécifiques de surfactine sont relevées entre les souches BBG113 et BBG111 (Tableau 19, page 182) après 24 h ou 48 h de culture. Ceci est sûrement dû à la forte activité de  $P_{srfa}$  chez *B. subtilis* 168 après la fin de la phase exponentielle de croissance, comme cela a été montré dans notre étude par le biais des fusions avec le gène *lacZ* et dans une étude récente (Duitman *et al.*, 2007).

Néanmoins le caractère constitutif de la biosynthèse de la surfactine chez BBG113 et BBG131 en fait des outils très intéressants pour la mise en œuvre d'un procédé de production en continu de la surfactine. Pour la réalisation de ce procédé, la souche BBG131 sera préférée à sa souche mère car elle a l'avantage de ne produire, à des concentrations très élevées, que de la surfactine.

Ces travaux sur l'étude de la synthèse constitutive de surfactine ont permis la construction de souches très intéressantes pour l'étude du rôle de la surfactine et de la plipastatine dans la lutte biologique. Ces travaux ont surtout permis d'obtenir une souche surproductrice de surfactine (BBG131) qui sera utilisée par la suite dans le procédé intégré de production et d'extraction de la surfactine.

#### 4.8. VALORISATION DES RESULTATS

Ces travaux ont donné lieu à la publication de trois articles, trois communications orales et cinq communications affichées dans des congrès nationaux et internationaux (l'orateur est souligné). Toutes ces communications ayant été soumises à un comité de lecture.

##### 4.8.1. Publications

Jacques, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., Guez, J-S., Béchet, M., Caboche, S., Coucheney, F., **Coutte, F.**, Tapi, A., et Leclère, V. (2007). La synthèse peptidique non ribosomique source de biodiversité de composés actifs. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 22, 234-240.

Guez, J.S., **Coutte, F.**, Drucbert, A.S., Chihib N.E., Danzé, P.M. and Jacques, P. (2009). Resistance of the cell wall to degradation is a critical parameter for isolation of high quality RNA from undomesticated *Bacillus subtilis*. *Archiv. Microbiol.* 191(8), 669-673.

**Coutte, F.**, Leclère, V., Béchet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P. and Jacques, P. (2010). Effect of *pps* disruption and constitutive expression of *surfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives *J. Appl. Microbiol* (accepté, doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04683.x).

#### 4.8.2. Communications orales

**Coutte, F.**, Leclère, V., Béchet, M., Lecouturier, D., Dhulster, P. et Jacques P. Impact de l'expression constitutive de *srfA* sur la production de surfactine et sur la physiologie de *Bacillus subtilis* (2007) 7<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France, 30 Mai-1<sup>er</sup> Juin.

Leclère, V., Béchet, M., Brans, A., **Coutte, F.**, Chollet-Imbert, M., Fickers, P., Gancel, F., Guez, J. S., Joris, B., Ongena, M. et Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides properties leading to versatile weapons for plant disease biocontrol Bacell 08, Oslo, Norvège, 27-29 March.

Jacques, P., Leclère, V., Béchet, M., **Coutte, F.**, Chollet-Imbert, M., Dhulster, P., Fickers, P., Gancel, F., Lecouturier, D. and Guez, J.S. (2008) Genetic and bioprocess engineering applied to the overproduction of biosurfactant from *Bacillus subtilis*. 3<sup>rd</sup> International Congress on bioprocesses in food industries. Hyderabad, India, 6-8 November.

#### 4.8.3. Communications affichées

**Coutte, F.**, Leclère, V., Ould Ahmed, M., Béchet, M., Lecouturier, D., Dhulster, P. and Jacques P. (2006) *Bacillus subtilis* surfactin overproducing recombinant strains allowing the development of production and purification bioprocess. 6<sup>th</sup> European Symposium on Biochemical Engineering Science, Salzburg, Autriche, 27-30 August.

**Coutte, F.**, Leclère, V., Béchet, M., Lecouturier, D., Dhulster, P. and Jacques P. Impact de l'expression constitutive de *srfA* sur la production de surfactine et sur la physiologie de *Bacillus subtilis*. (2007) 7<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes, France, 30 Mai-1<sup>er</sup> Juin.

**Coutte, F.**, Béchet, M., Leclère, V., Fickers, P., Brans, A., Joris, B., Lecouturier, D., Dhulster, P. and Jacques P. (2007) Influence of overexpression of mycosubtilin or surfactin synthetase on the phenotype of *Bacillus subtilis* strains. 4<sup>th</sup> International conference on functional genomics of Gram-positive microorganisms, Pisa, Italie, 24-28 June.

**Coutte, F.**, Leclère, V., Béchet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet-Imbert, M., Dhulster, P. and Jacques, P. (2009) Consequences of both constitutive synthesis of surfactin and disruption of plipastatin operon on phenotypic properties of *Bacillus subtilis*. 5<sup>th</sup> International Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms. 15<sup>th</sup> International Conference on Bacilli. 14–18 June, San Diego, California, USA.

Guez, J.S., **Coutte, F.**, Danzé, P.M. and Jacques, P. Resistance of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 cell wall to degradation is a critical parameter for isolation of high quality RNA (2009). 5<sup>th</sup> International Conference on Functional Genomics of Gram-positive Microorganisms. 15<sup>th</sup> International Conference on Bacilli. 14–18 June, San Diego, California, USA.

## 5. PRODUCTION EN CONTINU DE LA SURFACTINE PAR *B. SUBTILIS* BBG131 DANS UN BIOREACTEUR A MEMBRANE.

### 5.1. INTRODUCTION

Lors des travaux précédents, nous avons montré l'efficacité d'un procédé intégré de production d'extraction et de purification en continu des lipopeptides de *B. subtilis* ATCC 21332 (§ 3, page 149). Cette étude a permis d'obtenir des résultats satisfaisants pour la production de fengycine en mélange avec des quantités plus faibles de surfactine. Par la suite, des travaux de biologie moléculaire ont été menés à partir de la souche *B. subtilis* 168 afin d'obtenir une souche qui ne produit plus la plipastatine et dont la synthèse de la surfactine est devenu beaucoup moins dépendante des facteurs environnementaux. Cette souche a été nommée BBG131. Après avoir caractérisé son phénotype et ses activités biologiques présentés au chapitre précédent, nous allons dans un premier temps comparer sa production de surfactine en fioles d'Erlenmeyer à celle de *B. subtilis* ATCC 21332. Ensuite nous analyserons ses performances en production de surfactine dans le procédé intégré précédemment décrit.

### 5.2. ETUDE PRELIMINAIRE DE LA PRODUCTION DE SURFACTINE EN FIOLE.

Dans cette étude, les souches *B. subtilis* BBG131 et ATCC 21332 ont été cultivées en fiole d'Erlenmeyer dans du milieu de Landy tamponné avec du MOPS 0,1M. Ces études ont été menées à 30°C et à 37°C sous agitation à 130 tpm pendant 48 h.

Les quantités de surfactine et de biomasse produites ont été mesurées comme nous l'avons décrit précédemment (§ 9.3, page 111 et § 9.4, page 112). Les résultats présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 20, page 194) confirment l'effet de la température sur la production de la surfactine. La production de surfactine est plus importante à 37°C qu'à 30°C pour les deux souches ; en contre-partie la croissance diminue entre la 24<sup>ème</sup> et la 48<sup>ème</sup> h de culture. L'effet de la température étant également important sur une souche productrice de surfactine de façon constitutive, il apparaît que d'autres paramètres que la modification de la régulation de l'expression doivent être invoqués. Les résultats obtenus confirment les performances de la souche mutante BBG131 en comparaison de la souche sauvage *B. subtilis* ATCC 21332. En effet la concentration de surfactine dans le bouillon de culture de *B. subtilis* BBG131 après 48 h d'incubation est près de 4 fois supérieure à celle obtenue avec la souche sauvage *B. subtilis* ATCC 21332.

Par ailleurs, les rendements de conversion du glucose en surfactine sont aussi nettement plus élevés chez la souche *B. subtilis* BBG131. Ces résultats nous confortent dans l'intérêt d'utiliser cette souche dans notre procédé intégré de production, d'extraction et de purification en continu des lipopeptides de *B. subtilis*.

Tableau 20 Production de surfactine en fiole d'Erlenmeyer par les souches de *B. subtilis* ATCC 21332 et BBG131\*.

Souche de <i>B. subtilis</i>	<b>21332</b>	<b>BBG131</b>	<b>21332</b>	<b>BBG131</b>
Température	<b>30°C</b>	<b>30°C</b>	<b>37°C</b>	<b>37°C</b>
Biomasse (g de M.S./L)	4,73 (SD = 0,76)	2,27 (SD = 0,1)	3,53 (SD = 0,40)	1,18 (SD = 0,22)
Surfactine (g/L)	0,21 (SD = 0,03)	0,61 (SD = 0,04)	0,44 (SD = 0,03)	1,54 (SD = 0,38)
$Y_{P/X}$ (g/g M.S.)	0,05 (SD = 0,01)	0,27 (SD = 0,01)	0,11 (SD = 0,02)	1,47 (SD = 0,63)
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,01	0,03	0,02	0,06

\*Les valeurs sont issues de la répétition de trois expériences et calculées après 48 h de culture.  
SD : Déviation standard.

### 5.3. PRODUCTION ET EXTRACTION EN CONTINU DE SURFACTINE PRODUITE PAR *B. SUBTILIS* BBG131

La souche BBG131 construite au cours de ces travaux présente l'avantage de ne produire que de grandes quantités de surfactine et de réaliser cette production de manière constitutive (Tableau 17, page 180 et Tableau 20, page 194). Elle est donc l'outil idéal pour étudier la production de ce lipopeptide en continu avec un recyclage total de la biomasse.

Comme nous l'avons observé précédemment avec la souche de *B. subtilis* ATCC 21332, la configuration d'aération qui permet la meilleure production de surfactine est celle utilisée dans le bioréacteur sans bulles 1, équipé d'un contacteur air/liquide à membrane externe en fibres de polyéthersulfone (2,5 m<sup>2</sup>, 0,65 µm)(Fig. 27, page 98 et Tableau 10, page 127). La culture continue est précédée d'une phase I de démarrage en batch (phase I).

L'effet du taux de dilution sur la production de surfactine a été étudié sur 2 cultures continues successives. Lors de la première culture, des taux de dilution de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  et  $0,2 \text{ h}^{-1}$  ont été testés, puis au cours de la seconde, des taux de  $0,3 \text{ h}^{-1}$  à  $0,5 \text{ h}^{-1}$  ont été appliqués en changeant les débits d'alimentation ( $F_1$ ) et de soutirage ( $F_2$ ) comme indiqué dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 6.3.1, page 101).

Lors de cette étude, les paramètres physiologiques tels que les concentrations en biomasse, en lipopeptides, en substrats et en métabolites primaires dans le bioréacteur ont été suivis, tout comme l'évolution de la quantité de lipopeptides et de métabolites primaires extraits et accumulés dans la cuve 3. Le taux de consommation de l'oxygène (OUR) et le taux de production du dioxyde de carbone (CPR) ont aussi été suivis. En outre, les paramètres opérationnels tels que l'oxygène dissous et la consommation d'acide ou de base nécessaire à la régulation du pH ont été suivis, ainsi que le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_{La}$ ) qui est mesuré avant et après les cultures.

#### 5.3.1. Effet du taux de dilution sur la croissance continue de *B. subtilis* BBG131 en milieu de Landy

La croissance durant les différentes phases de la culture continue est montrée dans la figure ci-dessous (Fig. 68, page 196). Lors de la phase batch, la valeur de l'oxygène dissous chute à 0 après 3 h de culture. Ce résultat est similaire à celui obtenu précédemment (§ 1.2.1, page 123 et Fig. 34, page 125). La concentration maximale de biomasse apparente obtenue durant la phase II est de 2,5 g de M.S./L, de 3,8 g de M.S./L durant la phase III, de 2,2 g de M.S./L durant la phase IV et de 3,0 g de M.S./L durant la phase V.

Par ailleurs à la fin de ces études, le lavage de la membrane d'aération permet le décrochage d'en moyenne 9,1 g de M.S., de même que 1,3 g de M.S. sont décrochés lors du lavage de la membrane de microfiltration, soit une biomasse totale adhérente de l'ordre de 10 g de M.S. Ce procédé dans ces conditions d'utilisation permet donc la production d'environ 20 g de M.S.

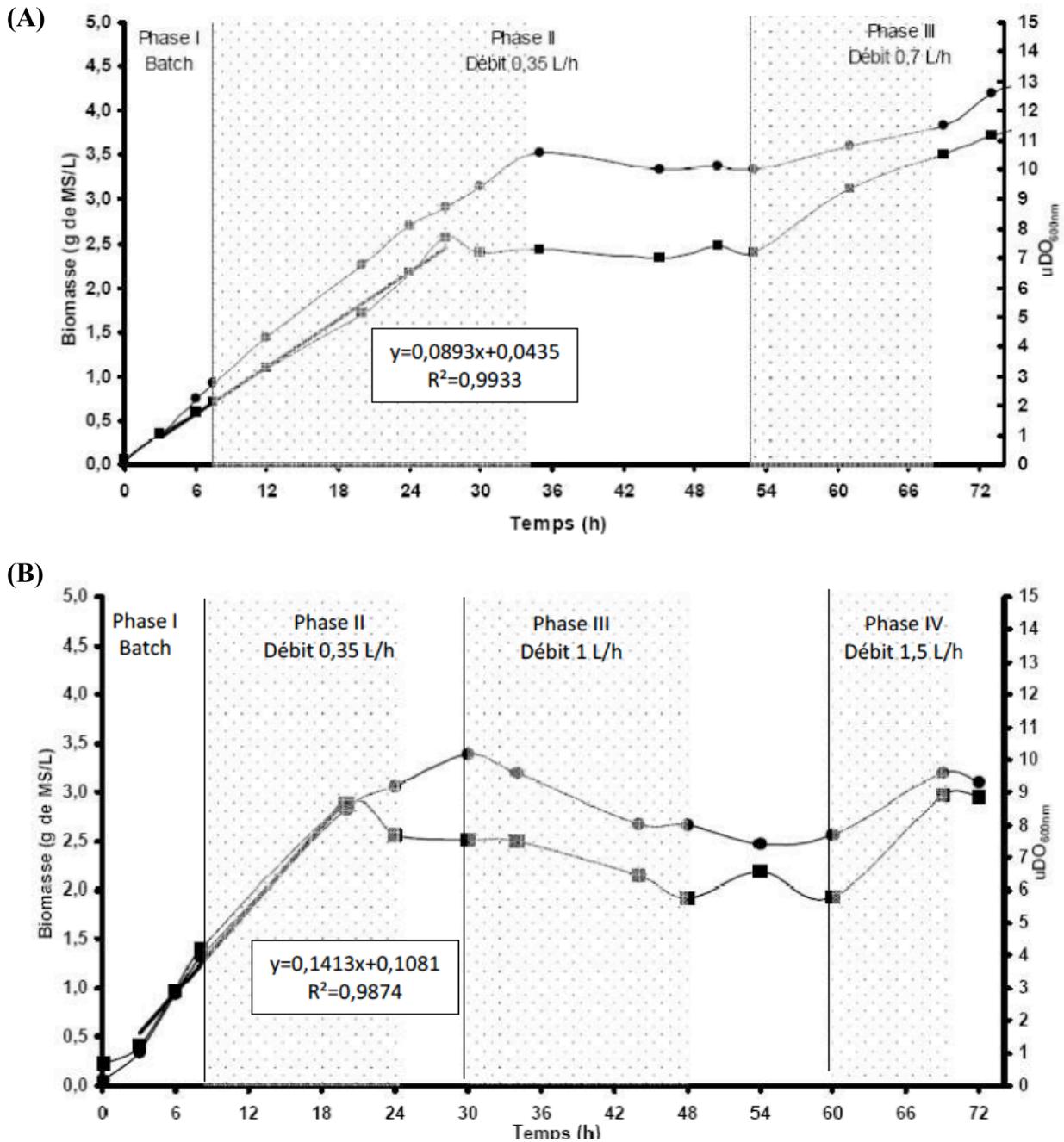


Fig. 68 Evolution de la concentration en biomasse dans le bioréacteur en fonction du taux de dilution. Culture continue de *B. subtilis* BBG131 à 37°C en milieu de Landy. (A) Première expérience ; (B) Deuxième expérience. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par des zones en pointillés.  
 ■ Biomasse (g de M.S./L); ● Densité optique à 600 nm.

Lors des périodes stationnaires, la croissance est quasiment nulle. Ceci montre que certaines conditions régissant la culture sont limitantes. L'augmentation du débit d'alimentation entre la phase II et la phase III engendre une importante augmentation de la biomasse produite.

Lors de la deuxième expérience, l'augmentation du taux de dilution entre la phase II et la phase IV provoque une diminution de la biomasse en suspension. La diminution de la concentration des cellules en suspension entre les phases II et IV pourrait être due à la production d'un composé inhibiteur. Par la suite, l'augmentation du taux de dilution entre la phase IV et la phase V permet un regain de croissance de l'ordre d'1 g de M.S./L.

### 5.3.2. Effet du taux de dilution sur la production et l'extraction en continu de la surfactine

Les analyses de la production de lipopeptides ont été menées dans le bioréacteur et dans la cuve 3 en fonction du temps. Dans les figures ci-dessous (Fig. 69, page 198), il peut être observé que la production de surfactine apparaît dans le bioréacteur après la 6<sup>ème</sup> heure de culture, ceci signifie que les 2,5 m<sup>2</sup> de fibres de la membrane sont déjà saturés en surfactine.

Lors de la période stationnaire de la phase II, la concentration en surfactine dans le bioréacteur est alors de 315 mg/L. Le doublement du taux de dilution durant la phase III provoque une nette augmentation de la concentration de la surfactine qui atteint, à l'état stationnaire, 671 mg/L. Par contre, une nouvelle augmentation de ce taux fait drastiquement baisser cette concentration qui chute alors à 154 mg/L. Dans ce cas, en absence de croissance et de production importante de surfactine, un lessivage du bioréacteur a lieu, l'augmentation du débit provoquant une extraction plus rapide de la surfactine produite. La reprise de la croissance et de la production lors de la phase V permet d'atteindre à l'état stationnaire une concentration de 1500 mg/L dans le bioréacteur.

Comme lors de l'expérience précédente (§ 3.2.1.2, page 151), les quantités de surfactine produites sont extraites continuellement du bioréacteur par la membrane de microfiltration et se retrouvent concentrées dans la cuve intermédiaire (cuve 3) grâce à la séparation de ceux-ci et du bouillon de culture par la membrane d'ultrafiltration. Il est à noter que l'analyse des lipopeptides dans la cuve 4 montre que de faibles quantités, de l'ordre de 20 mg sont passées à travers les pores de la membrane d'ultrafiltration (données non présentées).

L'accumulation ayant lieu en continu lors des différentes phases de culture, nous pouvons observer sur la figure ci-dessous (Fig. 69, page 198) que les quantités de surfactine accumulées après les différentes phases sont respectivement de 4 470 mg après la phase II, de 11 740 mg après la phase III, de 11 762 mg après la phase IV et de 16 340 mg après la phase V. Ces résultats confirment la diminution de la production surfactine durant la phase IV.

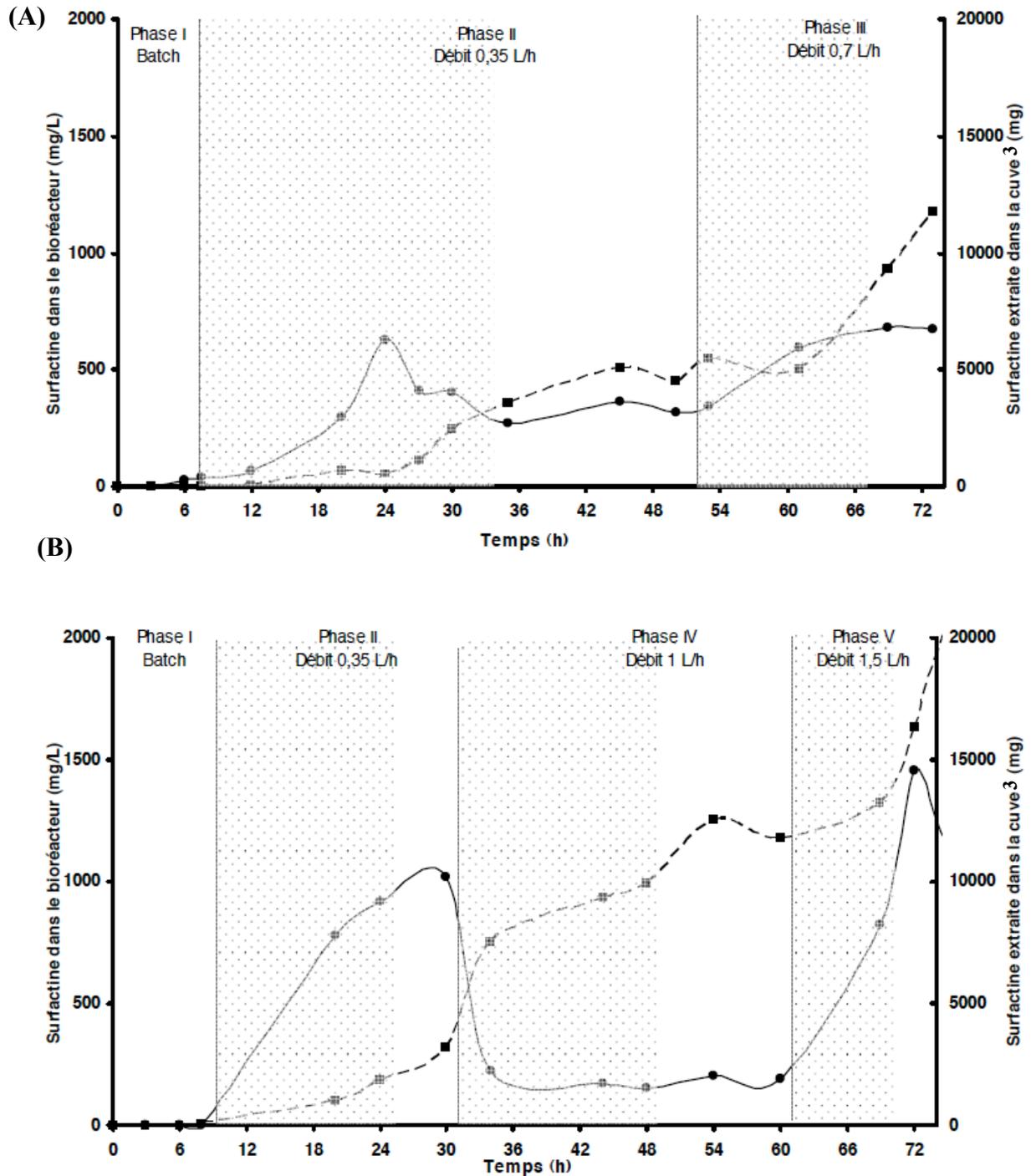


Fig. 69 Evolution de la concentration en surfactine produite par *B. subtilis* BBG131 dans le bioréacteur et de la quantité extraite dans la cuve 3 en fonction du taux de dilution . (A) Première expérience ; (B) Deuxième expérience. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transition sont représentées par des zones en pointillés ● Concentration en surfactine dans le bioréacteur (mg/L) ; ■ Quantité de surfactine extraite dans la cuve 3

### 5.3.3. Données physiologiques de la culture

Pour analyser la physiologie de la souche au cours de la culture en continu et surtout évaluer les vitesses des réactions de bioconversion, un suivi de la production des métabolites et de la consommation des substrats a été entrepris dans le bioréacteur mais aussi dans les autres cuves du procédé. De même, la régulation du pH a été suivie dans le bioréacteur. Par ailleurs, nous disposons pour ces expériences des données issues de l'acquisition en ligne de l'analyseur des gaz. Ces données vont nous permettre d'appréhender les facteurs limitant la croissance.

#### 5.3.3.1. Etude métabolique

Au regard des phénomènes de limitation de croissance relevés précédemment, les substrats et les métabolites primaires ont été dosés par CLHP comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 9.5, page 114). Dans la figure ci-dessous (Fig. 70, page 200), il peut être observé que le glutamate est généralement limitant durant la période stationnaire de la phase II. Le glucose est aussi largement consommé, mais sa concentration devient rarement nulle. Des variations de la concentration en glucose sont observées en fonction des différentes phases. Il en est de même pour le glutamate. Les concentrations en glucose dans le bioréacteur sont respectivement de 1 g/L, 0 g/L, 2 g/L et 0,65 g/L lors des phases II, III, IV et V. Les concentrations en glutamate dans le bioréacteur sont respectivement de 0 g/L, 2,2 g/L, 0,2 g/L et 0 g/L lors des phases II, III, IV et V. Cette étude nous permet de vérifier l'hypothèse proposée précédemment, à savoir que les substrats sont limitants durant la quasi-totalité du procédé. Les quantités apportées par l'alimentation permettent à la souche d'assurer sa maintenance et la production de métabolites aux concentrations observées mais la croissance semble bloquée.

Par ailleurs, l'étude de la production des métabolites primaires montre l'existence d'un métabolisme complexe avec en premier lieu une forte production de 2-3 butanediol qui commence dès la phase I de la culture, sans doute avec l'absence d'oxygène dissous résiduel et qui s'amplifie au cours des différentes phases. Lors des périodes stationnaires des différentes phases, les concentrations de ce métabolite sont respectivement en moyenne de 4,5, 2,5 et 4,8 g/L durant les phases II, III et V.

Il est très difficile de mesurer la concentration à l'équilibre durant la phase IV, en raison de son instabilité entre la 48<sup>ème</sup> et la 60<sup>ème</sup> heure de culture. En revanche, les vitesses de production du 2-3 butanediol au cours des autres phases peuvent être calculées. Elles sont respectivement de 0,45 g/L/h, 0,5 et de 2,4 g/L/h lors des phases II, III et IV.

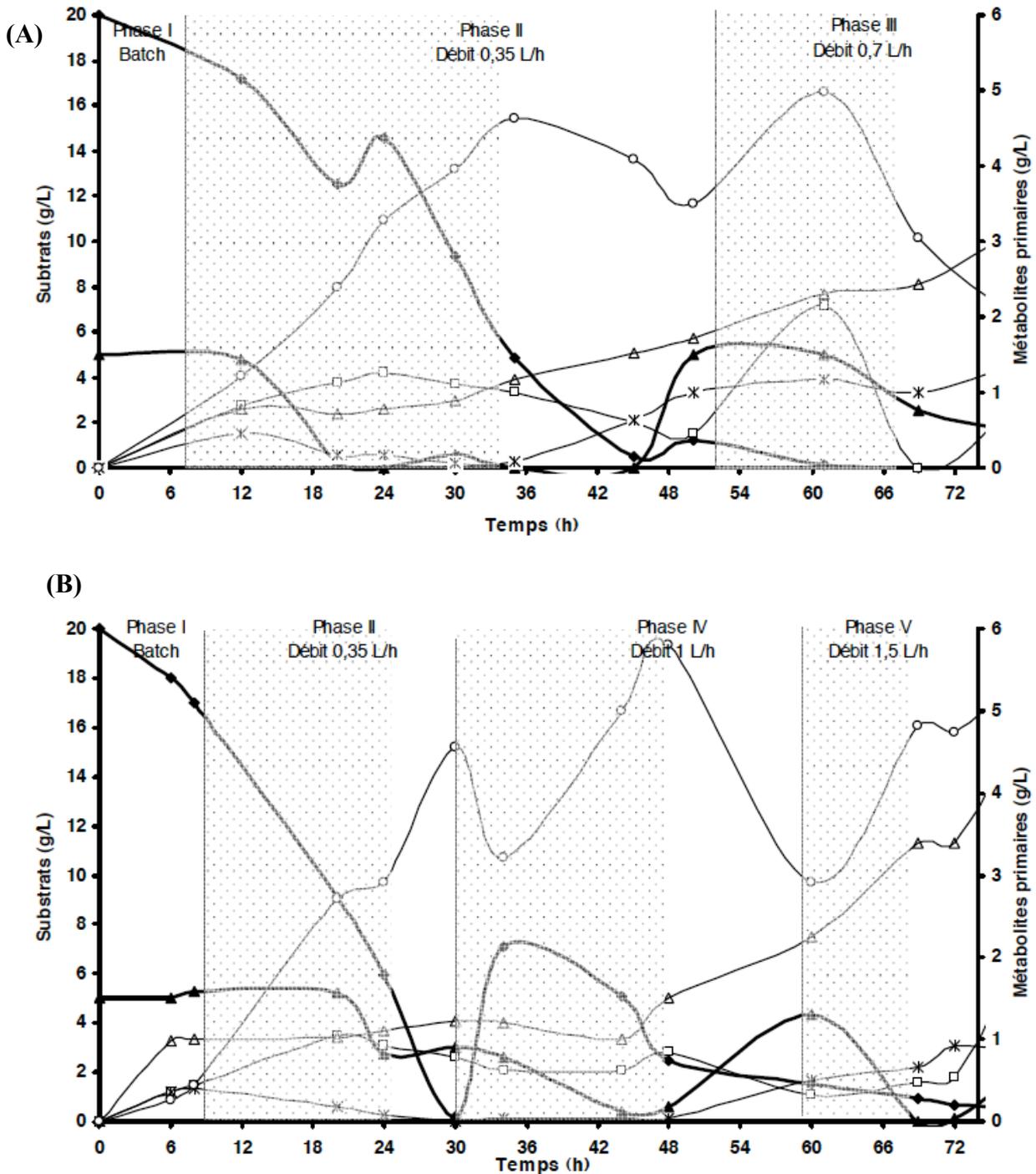


Fig. 70 Evolution de la concentration en substrats et en métabolites primaires dans le bioréacteur durant la culture continue de *B. subtilis* BBG131 à 37°C dans le milieu de Landy en fonction du taux de dilution. (A) Première expérience ; (B) Deuxième expérience. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par des zones en pointillés. Ligne en gras : ◆ Glucose ; ▲ Glutamate ; Lignes normales : □ Lactate ; ○ 2-3 butanediol ; \* Acétate ; △ Oxalate.

De plus, cette étude met aussi en relief une production mixte d'acides organiques avec majoritairement un acide organique que nous avons identifié par CLHP comme étant de l'oxalate. Sa concentration augmente de 2 à 4 g/L entre les phases II et V. Une production de lactate est observée durant la phase II dans la première et dans la deuxième expérience, puis cette production persiste dans les phases suivantes mais à concentration relativement faible. Enfin de l'acétate est aussi produit, également à faible concentration et plus particulièrement lors des phases III et IV. L'analyse de ces composés dans les cuves 3 et 4 révèle des concentrations quasi similaires de tous les composés, ce qui confirme que ceux-ci ne sont pas retenus par la membrane de microfiltration et la membrane d'ultrafiltration. Sauf pour l'oxalate qui s'accumule dans la cuve 3. Par ailleurs, le bilan carbone des deux expériences ne présente pas de déséquilibre majeur entre la quantité consommée et la quantité produite.

### 5.3.3.2. Analyse de la consommation en titrants

La consommation des titrants est suivie dans le bioréacteur pendant toute la durée de la culture. Ces résultats montrent que la régulation du pH de la culture à 7 engendre une consommation de NaOH importante, essentiellement lors des phases III, IV et V. Les résultats présentés dans la figure ci-dessous (Fig. 71, page 201) montrent que la culture ne demande que de la soude; ceci résulte de la production mixte d'acide observée lors des différentes phases et notamment à cause de la production d'acide oxalique.

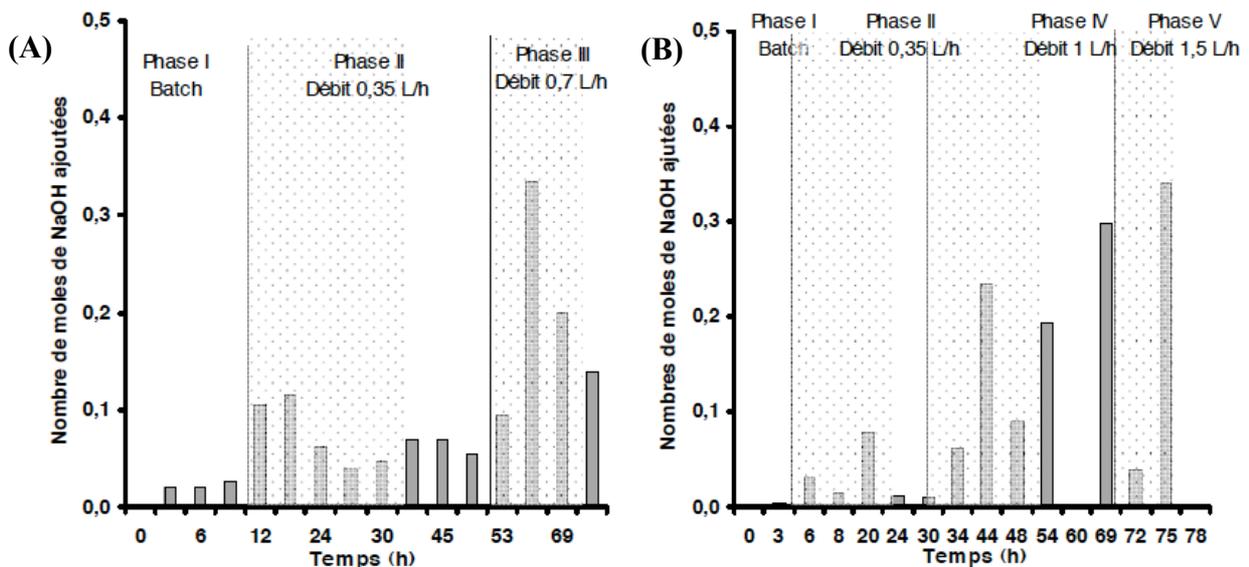


Fig. 71 Evolution de la consommation des titrants durant la culture continue de *B. subtilis* BBG131 à 37°C dans milieu de Landy en fonction du taux de dilution. (A) Première expérience ; (B) Deuxième expérience. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transition sont représentées par des zones en pointillés. Seul l'ajout de soude est présenté. L'ajout d'acide est nul.

La forte consommation enregistrée lors de la phase III, entre la 61<sup>ème</sup> heure et la fin de la culture semble correspondre à la production de lactate et d'acétate durant cette période (Fig. 71, page 201). Elle engendre un pic de consommation de l'ordre de 0,35 mmole de NaOH consommée en 8 h de temps.

### 5.3.3.3. Analyse de la consommation d'O<sub>2</sub> et de la production de CO<sub>2</sub>

Cette étude a été menée grâce à l'acquisition en ligne de l'analyse des gaz. Les vitesses de consommation de l'O<sub>2</sub> (OUR) et de production du CO<sub>2</sub> (CPR) ont été calculées grâce aux équations (6) et (7) précédemment décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 9.8, page 115). Sur la figure ci-dessous (Fig. 72, page 202), nous pouvons observer une « relative » stabilité de l'OUR et du CPR lors des phases stationnaires. L'accroissement de l'OUR d'une phase à la suivante nous permet de constater que le transfert d'oxygène s'effectue toujours à travers le contacteur air/liquide à membrane, et continue d'augmenter même après plusieurs jours de culture.

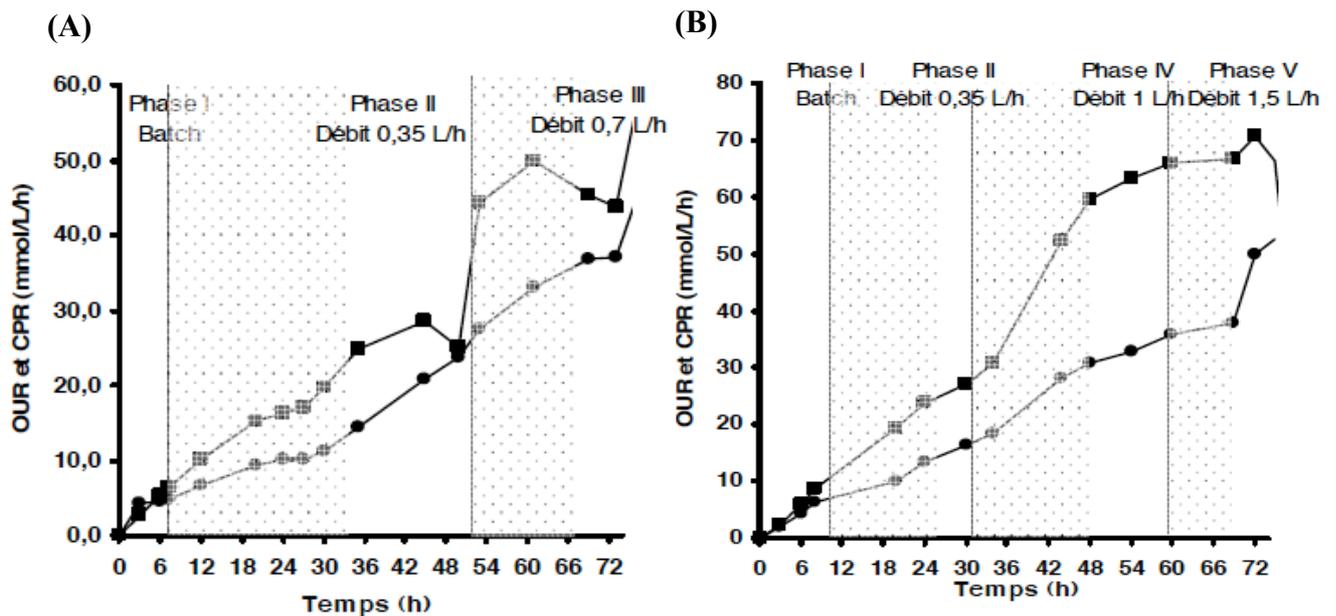


Fig. 72 Evolution des vitesses de consommation d'O<sub>2</sub> (OUR) et de production de CO<sub>2</sub> (CPR) durant la culture continue de *B. subtilis* BBG131 à 37°C dans le milieu de Landy en fonction du taux de dilution. (A) Première expérience ; (B) Deuxième expérience. Les différentes phases de la culture continue sont identifiées, de même les phases de transitions sont représentées par des zones en pointillés.  
 ■ CPR ; ● OUR.

Néanmoins il semble que ce transfert commence à être limité à partir de la fin de la phase III, puisque les OUR des phases III et IV sont équivalents à 37,1 mmole/L/h et 32,9 mmole/L/h. Il en est de même pour les CPR des phases IV et V qui atteignent des valeurs respectives de 63,6 et 66,6 mmole/L/h.

La mesure du  $K_{La}$  de la membrane en fin de culture devrait permettre de nous renseigner sur cette limitation. Le calcul du quotient respiratoire (§ 9.8, page 115) montre un écart significatif entre l'OUR et le CPR et plus particulièrement lors des phases IV et V, révélant un métabolisme du glucose particulier, résultant probablement d'une limitation en oxygène.

#### 5.3.4. Influence du taux de dilution sur la productivité

Il est intéressant de pouvoir mesurer l'effet du taux de dilution imposé à la culture continue sur la productivité et donc sur les vitesses de production respectives de chacun des produits (Tableau 21, page 203), et ainsi de pouvoir comparer ces données à celles obtenues lors de la culture en batch (§ 5.2, page 193). Suite à une détérioration de la membrane d'oxygénation, nous n'avons pu réaliser une culture batch en bioréacteur sans bulles, les résultats de la culture batch en fiole d'Erlenmeyer nous serviront donc de point de comparaison. Les résultats présentés en terme de productivité pour l'expérience en batch ont été calculés comme précédemment à la fin de la phase exponentielle de croissance lorsque la cinétique de croissance de la souche est à sa valeur maximale.

Tableau 21 Evolution des productivités en fonction du taux de dilution

	Phase II D=0,1 h <sup>-1</sup>	Phase III D=0,2 h <sup>-1</sup>	Phase IV D=0,3 h <sup>-1</sup>	Phase V D=0,5 h <sup>-1</sup>	Batch en fiole
X (g/L)	2,5	3,8	2,2	3,0	3,05
S (g/L)	1	0	2	0,6	ND
$r_X$ (g/L/h)	0	0	0	0	0,1
P (mg/L)	315	671	154	1500	817
$r_P$ surfactine (mg/L/h)	31,5	134,2	46,2	750	91
$Y_{P/S}$ surfactine (mg/g)	16,6	33,5	8,5	154,6	ND
$r_P$ 2-3 butanediol (mg/L/h)	0,4	0,5	ND	2,4	ND
$r_{O_2}$ (mmol/L/h)	20,6	37,1	32,9	37,8	ND
$r_{CO_2}$ (mmol/L/h)	28,6	43,6	63,3	66,6	ND
$r_S$ glucose (g/L/h)	1,9	4,0	5,4	9,7	ND
$r_S$ glutamate (g/L/h)	0,5	0,56	1,44	2,5	ND

Lors de la période stationnaire des phases II et III, les vitesses de production respectives de la surfactine sont de 31,5 mg/L/h et 134,2 mg/L/h. Le doublement du taux de dilution durant la phase III permet de quadrupler cette vitesse de production.

Par contre, l'augmentation au cours de la phase IV, engendre une chute de ce paramètre qui devient 3 fois moins important. Une fois de plus, l'arrêt de la croissance semble être l'explication de ce phénomène, d'autant plus que le passage à la phase V permet d'obtenir une vitesse extrêmement élevée de 750 mg/L/h. Comparés aux résultats obtenus lors de la culture batch en fiole d'Erlenmeyer, ces résultats montrent que les vitesses de production de la surfactine sont plus élevées au cours des phase III et V. La vitesse de production au cours de la phase II est plus faible que celle obtenue en fiole, révélant sûrement une limitation en glucose. L'analyse des vitesses de consommation du glucose et du glutamate montre un accroissement de celles-ci en fonction de l'augmentation du taux de dilution, même entre la phase II et la phase IV.

#### 5.4. ETUDE DU COLMATAGE DES MEMBRANES

##### 5.4.1. Lavages des membranes

Comme nous l'avons réalisé lors des cultures batch, l'intégrité des membranes a été évaluée selon les protocoles de lavage utilisés précédemment (§ 6.2.3, page 99 et § 6.3.4, page 105). L'intégrité de la membrane d'aération a été évaluée grâce à une mesure du  $K_{La}$  à la fin de la phase IV de la culture. L'intégrité des membranes de filtration est évaluée par une mesure du débit standard en eau. Lors de chaque étape de lavage, la biomasse décrochée est mesurée, tout comme la quantité de lipopeptides désorbée, ces informations sont reportées dans le tableau ci-dessous (Tableau 22, page 204).

Tableau 22 Lavage des membranes : Etude de la désorption de la surfactine\*

<b>Membrane</b>	<b>Biomasse (g M.S.)</b>	<b>Surfactine (mg)</b>
<i>Oxygénation</i>	9,1	583
<i>Microfiltration</i>	1,3	21
<i>Ultrafiltration</i>	0	70
<b>TOTAL</b>	<b>10,4</b>	<b>674</b>

\* Moyennes des quantités récupérées des différentes membranes lors des deux expériences, après deux lavages en eau à 30°C et deux lavages avec une solution de NaOH 0.1 M pH 10.0 à 50°C, comme décrit dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 6.2.3, page 99 et § 6.3.4, page 105).

Comme lors du procédé précédent, ces lavages révèlent qu'une quantité très importante de biomasse a adhéré sur la membrane d'oxygénation (9,1 g M.S.), de même que sur la membrane de microfiltration (1,3 g M.S.). De plus, des quantités non négligeables de surfactine sont majoritairement désorbées de la membrane d'oxygénation. C'est ainsi que les différents lavages ont permis de récupérer 674 mg de surfactine.

#### 5.4.2. Evolution du $K_{La}$

A la fin des deux différentes expériences, une mesure du  $K_{La}$  de la membrane d'oxygénation est réalisée selon la méthode du dégazage à l'azote comme décrit le chapitre « Matériels et Méthodes » (§ 9.8, page 115). La valeur de celui-ci après près de 74 h de culture est de  $12,6 \text{ h}^{-1}$  après la première expérience et de  $3,8 \text{ h}^{-1}$  après la seconde, soit 3 à 10 fois moins que celui-ci de la membrane propre ( $41,5 \text{ h}^{-1}$ ). Ce résultat confirme que le transfert d'oxygène est limité par le colmatage de la membrane d'oxygénation mais celui-ci reste néanmoins encore assez élevé pour permettre la croissance.

#### 5.4.3. Débit standard en eau des membranes de filtration

A la fin de l'expérience, les membranes sont rincées à l'eau, puis la mesure du débit standard en eau est effectuée comme elle avait été réalisée avant l'expérience. Les résultats pour la membrane de microfiltration et pour la membrane d'ultrafiltration sont présentés dans la figure ci-dessous (Fig. 73, page 206). L'évolution du débit standard en eau de la membrane d'ultrafiltration montre une très faible diminution par rapport au débit initial (Fig. 73 B, page 206). Ce qui n'est pas le cas de la membrane de microfiltration dans laquelle celui-ci est 10 fois plus faible que le débit initial (Fig. 73 A, page 206). Cette forte diminution résulte du colmatage de la membrane par les 1,2 g M.S. de biomasse restant sur la membrane et formant une couche limite.

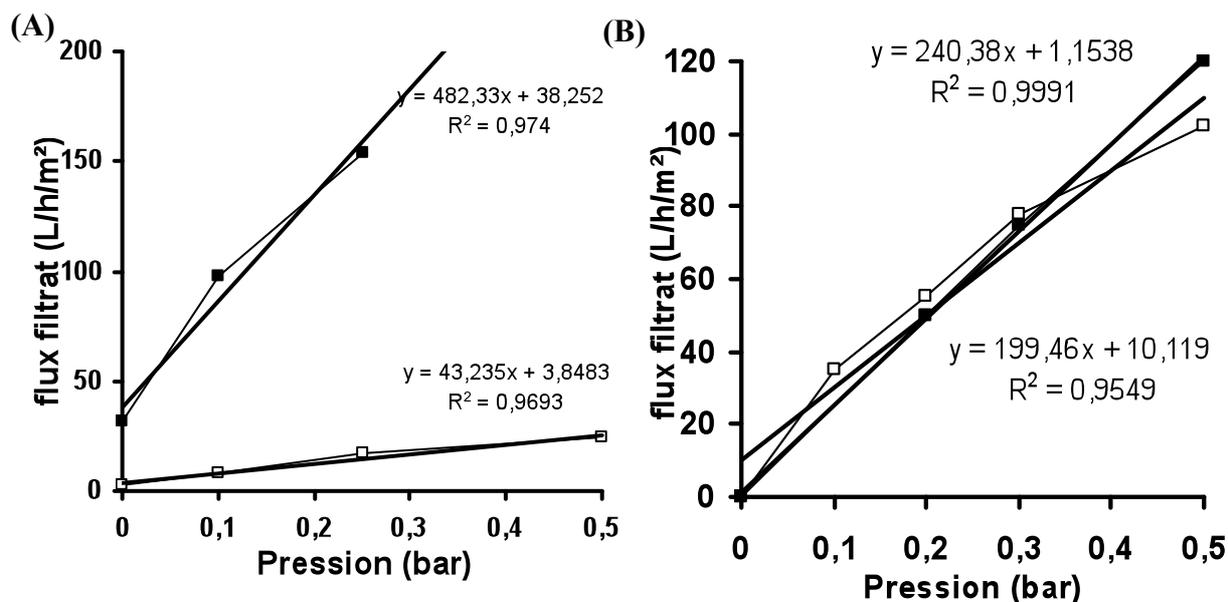


Fig. 73 Evolution des débits standards en eau des membranes de microfiltration (A) et d'ultrafiltration (B). ■ Débit de la membrane propre □ Débit de la membrane après l'expérience.

## 5.5. DISCUSSION

Dans ces travaux, nous avons combiné deux stratégies pour optimiser la production de surfactine ; c'est ainsi que la souche *B. subtilis* BBG131 issue de nos travaux de biologie moléculaire a été cultivée dans le procédé intégré de production, d'extraction et de purification en continu que nous avons étudié précédemment avec la souche *B. subtilis* ATCC 21332. La membrane externe en fibres creuses de polyéthersulfone (2,5 m<sup>2</sup>, 0,65 µm), choisie pour aérer la culture, s'est avérée être une bonne configuration pour la production en continu de la surfactine. En effet une fois cette membrane saturée, la surfactine accumulée dans le milieu de culture a pu être extraite en continu. Le seuil de saturation de la membrane s'est révélé être très proche de celui déterminé précédemment (269 mg/m<sup>2</sup>) en dépit des quantités importantes de surfactine produites au cours de ces expériences. L'utilisation d'une souche constitutive dans ce type de bioréacteur à membrane présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle permet une production précoce de la surfactine qui saturé alors très vite la membrane d'aération et qui peut alors s'accumuler dans le milieu et être extraite très rapidement, par ailleurs cette synthèse est indépendante de la croissance et des phénomènes liés au quorum-sensing.

Bien que n'ayant pas encore été comparée à sa souche mère BBG111, la souche BBG131 est un outil performant pour la production de surfactine surtout par rapport à la souche sauvage de *B. subtilis* ATCC 21332. Dans ces conditions de production et d'extraction continue, après 74 h de culture, nous avons produit et extrait 14 g de surfactine à l'issue de la première expérience et près de 20 g après la seconde. Il n'existe pas de résultat comparable dans la littérature, car la production en continu de surfactine sans l'utilisation d'un bioréacteur sans bulles est rendue fastidieuse par le fort moussage. Par ailleurs, la quantité de lipopeptides adsorbée sur les différentes membranes ne représente que 5 à 10 % de la production totale, la surfactine s'adsorbant majoritairement sur la membrane d'oxygénation. L'étude de la production de lipopeptides nous a permis d'identifier que le taux de dilution influait directement sur la vitesse de production de la surfactine, une augmentation de celui-ci augmentant directement cette vitesse. Une vitesse de production de 750 mg/L/h est atteinte lorsque le taux de dilution est de  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , mais cette valeur est toutefois à interpréter de façon mesurée car elle est obtenue avec des cellules dans un état physiologique particulier, qui redémarrent leur croissance après une longue période de limitation en substrat.

Nous n'avons pas pu augmenter plus ce débit car la limitation du flux de filtrat de la membrane de microfiltration a été atteinte dans ces conditions de pression et de colmatage de la membrane, soit  $3,57 \text{ L/h/m}^2$ .

Comme nous l'avons démontré précédemment, le contacteur air/liquide à membrane permet la croissance de *B. subtilis* et la production de surfactine sans la formation de mousse (§ 1.2, page 122). Néanmoins lors de son utilisation en continu, couplé à un recyclage total de la biomasse, ce procédé n'a pas permis d'obtenir une forte production de biomasse. En effet, l'analyse de la croissance révèle une production totale d'environ 20 g M.S. de biomasse, ce qui demeure un résultat, une fois de plus assez faible, quand cette dernière est recyclée totalement. Le facteur limitant majoritairement la production de biomasse semble être, dans ces expériences, le substrat. Cette hypothèse peut être vérifiée premièrement par l'analyse des concentrations dans le bioréacteur qui révèle une limitation en glucose et en glutamate (Fig. 70, page 200). Néanmoins, l'augmentation du taux de dilution entre les phases II et IV semble avoir eu un effet néfaste sur la croissance puisque celle-ci diminue alors qu'elle se trouvait en limitation de substrat à la fin de la phase II. Une augmentation de la biomasse adhérente durant cette phase n'est pas à exclure.

Par ailleurs, la synthèse constitutive de la surfactine, qui caractérise la souche BBG131, semble être très consommatrice de glucose au détriment de la croissance. Ce phénomène avait été déjà observé lors de sa culture en fiole, où un déclin de la biomasse avait lieu après 24 h de culture dans le milieu Landy MOPS.

La production mixte d'acides organiques et de 2-3 butanediol révèle que la culture est également limitée en oxygène (Nakano *et al.*, 1997). L'analyse du  $K_La$  en fin de culture indique que le transfert d'oxygène est resté à une valeur significative ( $13,5 \text{ h}^{-1}$ ), permettant normalement une croissance plus importante que celle observée. Néanmoins, la présence dans le bioréacteur de concentrations non négligeables de lactate, d'acétate et de 2-3 butanediol semble révéler une croissance en limitation d'oxygène comme cela été montré lors de travaux précédents (Cruz *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 1997). La diminution de la production de lactate, observée lors des phases III et IV alors que la production des autres acides ne diminue pas, pourrait s'expliquer par une réincorporation de celui-ci et sa consommation par la cellule en vue de pallier la limitation en substrat.

La production très significative d'oxalate représente un résultat intéressant, car comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la production d'oxalate a déjà été décrite chez *Bacillus edaphicus* mais n'a jamais été décrite chez *B. subtilis* (Sheng et He, 2006). Cette production pourrait résulter de l'hydrolyse de l'oxaloacétate en oxalate et acétate, sous l'action d'une oxaloacétase. S'il s'agit bien d'une hydrolyse de l'oxaloacétate, ceci signifierait que ce composé est en excès par rapport aux besoins de la cellule. En définitive, la demande en précurseurs métaboliques de la souche *B. subtilis* BBG131, et notamment le pyruvate et l'acétyl-CoA qui sont des intermédiaires très importants dans la synthèse de la surfactine, rend difficile la compréhension de ce métabolisme. Une analyse plus approfondie de la régulation du cycle de Krebs dans ces conditions est donc nécessaire pour comprendre ce métabolisme complexe et les réels besoins en substrat de la cellule dans ces conditions particulières d'aération par membrane.

Tous ces résultats montrent l'efficacité du système que nous avons développé pour la production, l'extraction et la purification des lipopeptides. Cette étude nous a permis d'identifier les paramètres limitant le système, plus particulièrement ici l'apport de substrat qui semble limitant pour la souche BBG131, grande consommatrice de glucose.

Mais beaucoup de paramètres restent encore à étudier pour évaluer les performances de ce procédé et de cette souche, notamment la comparaison à une expérience en batch dans les mêmes conditions de culture, mais aussi l'impact du recyclage total des cellules. Même si ce dernier paramètre semble être indispensable pour pouvoir travailler à des taux de dilution élevés et atteindre des vitesses de production importantes comme nous l'avons observé dans ces travaux (Tableau 21, page 203).

La production de surfactine obtenue lors de ces expériences a permis la récupération de plusieurs dizaines de grammes de surfactine en solution, rendant ce procédé de production très intéressant en vue d'une future commercialisation de la surfactine. Même si ces travaux révèlent une forte consommation en substrat qui augmente le coût de production, le prix actuel de la surfactine commercialisée (7000 €/g) laisse entrevoir de très intéressantes perspectives de valorisation. L'aboutissement de ces travaux et de ce procédé de production reste donc l'analyse de la pureté de cette solution de surfactine et des techniques de purification avancées qui pourraient être couplées à ce procédé pour l'obtention de surfactine sous forme solide ayant une pureté proche de 100%.

## 6. PURIFICATION DES LIPOPEPTIDES DE *B. SUBTILIS*

### 6.1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons décrit dans la synthèse bibliographique il existe plusieurs méthodes pour l'extraction et la purification des lipopeptides (§ 1.7, page 54). Si celles-ci apportent des résultats satisfaisants en terme de rendement d'extraction allant de 90 à 100%, elles présentent des taux de pureté assez faibles. C'est le cas notamment de la précipitation acide qui permet 97% d'extraction mais seulement 55% de pureté (Chen et Juang, 2008). Quand cette méthode est suivie d'une étape d'ultrafiltration ayant un seuil de coupure de 100 kDa, la pureté de la solution de surfactine obtenue passe alors à 75%. Néanmoins cette étape ne permet pas de retrouver la totalité de la quantité initiale de surfactine et en fonction de la nature de la membrane utilisée le taux de perméation de la surfactine est de 64% (membrane en ester de cellulose) et de 71% (membrane en PES) (Chen et Juang, 2008). D'autres études ont montré que la combinaison de deux étapes d'ultrafiltration permettait d'atteindre 95% de pureté (Isa *et al.*, 2007).

Suite au procédé en continu décrit précédemment (§ 3, page 149), nous avons pu obtenir une solution de surfactine, à partir de la culture de *B. subtilis* BBG131 (pureté 50%). Afin de pouvoir conserver et réutiliser ces molécules, des étapes de purification par ultrafiltration, de concentration par évaporation et de lyophilisation ont été entreprises et étudiées comme décrit précédemment (§ 7, page 105). Le rendement de ces différentes étapes a été mesuré par dosage CLHP, ainsi que la pureté des échantillons lyophilisés par spectrométrie de masse.

## 6.2. PURIFICATION PAR ULTRAFILTRATION ET DIAFILTRATION

La solution provenant de la première expérience de production en continu de surfactine par *B. subtilis* BBG131 a été purifiée sur une membrane d'UF 10 kDa (Sartorius) en cellulose régénérée, puis diafiltrée quatre fois consécutives avec de l'eau distillée et enfin ultrafiltrée en présence de 70% de méthanol. Toutes ces étapes se déroulent sous une pression de 0,5 bar.

Les quantités de lipopeptides ont été dosées dans les ultrafiltrats, dans les quatre diafiltrats et dans l'ultrafiltrat final ainsi que dans la solution concentrée issue d'une étape d'évaporation sous vide. Les puretés initiales et finales des solutions ont été évaluées par CLHP et par mesure du poids sec.

Tableau 23 Etude de la purification de la surfactine issue de la première expérience de culture en continu de *B. subtilis* BBG131

	Quantité de surfactine (mg)
<b>Quantité initiale de surfactine</b>	14095
Pureté	50%
<b>Quantités perdues lors des étapes</b>	
Ultrafiltration	0
Première diafiltration	1475
Deuxième diafiltration	1702
Troisième diafiltration	561,8
Quatrième diafiltration	385,8
Solution concentrée	9930
<b>Bilan</b>	
Rendement	70,4%
Pureté	95 %

A partir d'une solution de surfactine d'une pureté d'environ 50%, nous avons obtenu une solution pure à 95% (Tableau 23, page 210). Les pertes engendrées par les différentes étapes de cette purification s'élèvent à 30%. La surfactine part essentiellement lors des deux premières étapes de diafiltration. Mais ces quantités de surfactine qui passent dans le diafiltrat peuvent être récupérées par une nouvelle étape d'ultrafiltration.

### 6.3. LYOPHILISATION DES LIPOPEPTIDES

La lyophilisation des lipopeptides a été entreprise avec des solutions concentrées issues des fermentations et pré-purifiées par ultrafiltration, diafiltration puis concentrées par évaporation. Celle-ci s'effectue selon le mode opératoire décrit précédemment (§ 7.4, page 107). Les pertes liées à cette étape sont quasiment nulles et proviennent essentiellement de la difficulté de récupérer la totalité de la matière solide de la cuve ayant servi à la lyophilisation.

### 6.4. SOLUBILISATION ET VERIFICATION DE LA PURETE DES PRODUITS

Celle-ci est réalisée à partir des échantillons précédemment lyophilisés, les lipopeptides sont remis en solution à 1 g/L dans différents solvants et la concentration est ensuite vérifiée par CLHP, afin de déterminer leur taux de solubilisation.

Ces taux de solubilisation sont les suivants : 100% dans le MeOH 100% ; 40% dans le MeOH 10% ; 100% dans le NaHCO<sub>3</sub> 0,1M pH 8,15 et 93,4% dans du MeOH 10% + NaHCO<sub>3</sub> 0,1M.

La pureté du lyophilisat a ensuite été vérifiée, grâce à un couplage CLHP-SM, sur une solution de surfactine à 1 g/L dans du MeOH 100%. Cette méthode, par spectrométrie de masse, permet d'analyser le contenu de chaque pic, préalablement séparé par CLHP. Les résultats de cette analyse sont reportés dans la figure et le tableau ci-dessous (Fig. 74 et Tableau 24, page 212).

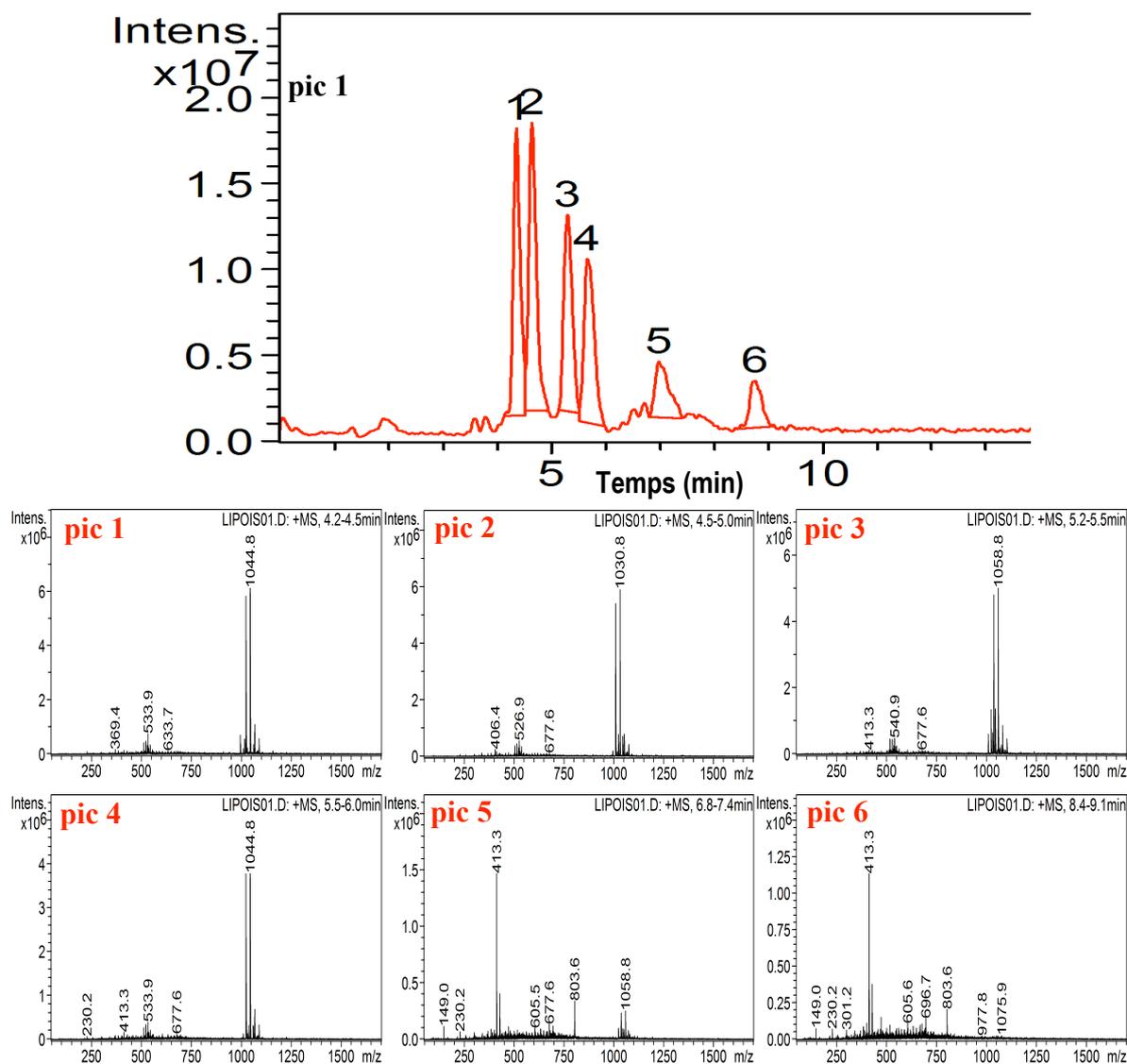


Fig. 74 Analyse CLHP-SM de la surfactine, issue du procédé intégré de production et d'extraction en continu, purifiée par ultrafiltration et diafiltration

Les 5 premiers pics montrent une intensité importante avec un signal  $m/z$  correspondant à la masse des ions  $M+Na^+$  des homologues de C13, C14 et C15 de la surfactine A. Dans le pic 5, nous pouvons observer que la quantité du composé inconnu de masse 413,3 devient non négligeable.

De même, dans le pic 6 ce composé est aussi présent mais un autre composé inconnu majoritaire de masse 803,6 est aussi révélé, cette masse ne correspond à aucun homologue de surfactine connu, ni à d'autres lipopeptides. Il s'agit donc ici d'une contamination qui ne représente néanmoins que 6,5% de l'ensemble.

Tableau 24 Identification des différents isoformes de surfactine produit lors de la culture continue de *B. subtilis* BBG131

Pic	Aire	Masse (M+z)	Type de lipopeptide	% total
1	14857229	1044,8	Surfactine A C14	22,4
2	163378811	1030,8	Surfactine A C13	24,7
3	123658894	1058,8	Surfactine A C15	18,7
4	124778115	1044,8	Surfactine A C14	18,9
5	58341289	1058,8	Surfactine A C15	8,8
		413,3	Non identifié	
6	42860263	803,6	Non identifié	6,5
		413,3	Non identifié	

## 6.5. DISCUSSION

La méthode de purification par ultrafiltration mise en oeuvre dans ces derniers travaux permet de récupérer plus de 70% de la surfactine produite. Par ailleurs, les étapes de diafiltration et d'ultrafiltration permettent d'obtenir une solution pure à plus de 90%. Cette méthode se révèle donc efficace pour la transformation du produit fini et présente les avantages de pouvoir traiter une grande quantité de produit, mais elle peut être aussi aisément couplée au procédé de production intégré que nous avons mis en oeuvre dans ces travaux. De plus, la méthode est faiblement consommatrice de solvant, puisqu'une seule étape nécessite l'utilisation de MeOH, qui peut par ailleurs être régénéré lors de l'étape d'évaporation sous vide.

---

**CHAPITRE IV :**  
**CONCLUSION ET**  
**PERSPECTIVES**

La surfactine et la fengycine possèdent de nombreuses activités biologiques, la surfactine se caractérisant principalement par un fort pouvoir tensioactif, la fengycine par une puissante activité antifongique. Ces deux molécules présentent une faible CMC et sont biodégradables. Ces deux qualités permettent d'envisager leur utilisation dans de nombreuses applications industrielles (Banat, 2000), mais aussi environnementales notamment dans la dépollution des sols et dans la lutte contre les phytopathogènes (Ongena et Jacques, 2008). Néanmoins leur production à grande échelle, et plus particulièrement celle de la surfactine, demeure fastidieuse en raison de l'importante formation de mousse engendrée en culture aérée et de la complexité de la régulation de la synthèse de la surfactine chez les souches de *B. subtilis*.

Dans les travaux présentés dans la thèse, une approche étendue de l'optimisation de la production de lipopeptides de *B. subtilis* a été développée. Ces travaux ont nécessité l'utilisation de connaissances et de technologies allant du génie moléculaire au génie des procédés. Premièrement, il a fallu trouver une solution originale pour éviter la formation de mousse afin de pouvoir extraire et purifier en continu les lipopeptides produits par *B. subtilis*. La réalisation d'un procédé intégré de production a donc nécessité une étape indispensable de mise en œuvre d'un bioréacteur à membrane innovant utilisant la technologie de la contacteur air/liquide à membrane pour aérer sans bulles la culture et ainsi empêcher la formation de mousse. Les tests effectués dans un pilote de laboratoire prouvent que ce procédé membranaire permet d'obtenir une croissance microbienne satisfaisante et une production de lipopeptides sans mousse, ce qui est crucial pour envisager l'extraction de ces derniers du bouillon de culture. Une production significative de surfactine a été obtenue avec les trois types de bioréacteur sans bulles que nous avons mis en œuvre. Ce qui est plus particulièrement intéressant, c'est que la culture dans le bioréacteur sans bulles à membrane en polypropylène engendre un très haut niveau de production de la fengycine par *B. subtilis* ATCC 21332. Ce dernier résultat souligne l'importance des conditions de culture et probablement l'oxygénation dans la régulation de la synthèse de ces composés lipopeptidiques.

---

Par la suite, une étude du comportement de la surfactine au contact de ces contacteurs air/liquide à membrane, a permis d'identifier et de caractériser l'adsorption de la surfactine sur ces dernières et ses effets sur le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène. Au regard de ces résultats, une étude plus approfondie a révélé que ce phénomène était dépendant de la température, de la porosité et de la nature des fibres composant la membrane d'aération. La réalisation de ces travaux a permis d'identifier deux configurations différentes pour surproduire sans mousse, soit la surfactine, soit la fengycine. A partir de ces travaux, nous avons mis en œuvre un procédé intégré de production, d'extraction et de purification des biosurfactants microbiens. Ce procédé repose sur le couplage à un bioréacteur microbien de membranes en fibres creuses pour l'aération de la culture et l'extraction des biosurfactants. La culture en continu de la souche de *B. subtilis* ATCC 21332 dans ce procédé a permis une production inégale en fengycine mais aussi une production de surfactine. Dans ce procédé, l'augmentation du taux de dilution a un effet favorable sur les cinétiques de production des lipopeptides. Ce procédé a permis la production de 26,27 g M.S. de biomasse, 6,8 g de fengycine et 1,6 g de surfactine. Si les résultats demeurent très satisfaisants en production de lipopeptides, ceux de la biomasse sont assez faibles pour un procédé où les cellules sont totalement recyclées. Le facteur limitant la croissance dans ce cas a été clairement identifié lors de notre étude comme étant l'apport d'oxygène. Néanmoins, si les effets des conditions d'oxygénation sur la production de biomasse et de surfactine ont déjà été établis dans la littérature, ceux sur la production de fengycine, et plus particulièrement dans nos conditions d'aération, restent encore à déterminer.

La dernière étape du travail présenté dans la thèse a donc porté sur la construction d'une souche ne produisant que de la surfactine, et de manière contrôlée, à partir de la souche *B. subtilis* 168 susceptible de produire la surfactine et la plipastatine. Ces travaux ont également permis de démontrer les effets tantôt synergiques, tantôt antagonistes de ces deux lipopeptides sur différentes propriétés biologiques.

Premièrement, les souches constitutives BBG113 et BBG113B présentent une colonisation plus rapide du milieu que la souche BBG111 et un léger accroissement de la synthèse de plipastatine. Ces deux effets conjugués pourraient expliquer l'amélioration des effets antagonistes contre les champignons. La meilleure colonisation de la souche pourrait contribuer à une meilleure dispersion de la plipastatine produite elle-même en plus grandes quantités. Une telle synergie devrait être intéressante pour étudier les applications des souches de *B. subtilis* dans des procédés de lutte biologiques étant donné qu'il a été récemment montré que la surfactine et la plipastatine sont capables d'induire la résistance systémique des plantes (Ongena *et al.*, 2007 ; Ongena et Jacques, 2008). Par ailleurs, la suppression de la production de la plipastatine amplifie de façon spectaculaire les potentialités de croissance invasive des souches productrices de façon constitutive de surfactine. Ce résultat pourrait être particulièrement intéressant pour l'exploitation de ces souches par exemple en bioremédiation.

Les deux constructions entreprises dans ces travaux et les analyses menées sur l'expression des gènes dépendant de l'opéron *urfA* ont permis d'éclaircir les mécanismes de régulation responsables des phénotypes différenciés précédemment décrits. Ils ont donné des résultats différents par rapport à ceux décrits par Nakano *et al.* en 1991. Si nos résultats confirment que la séquence, non codante pour les synthétases, située en amont de l'opéron *urfA*, est indispensable à une bonne production de surfactine chez *B. subtilis*, il demeure que les profils d'expression du gène *urfA* et *comS*, chez la souche BBG113B, sont bien plus élevés qu'attendu. Cette séquence semble avoir un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de l'opéron *urfA* ; néanmoins cette hypothèse doit être vérifiée lors d'une étude plus approfondie.

Deuxièmement, l'interruption de la synthèse de plipastatine chez la souche BBG113 a permis l'obtention de la souche BBG131 qui présente une production spécifique de surfactine très intéressante pour son utilisation dans un procédé de production en continu. Forts des connaissances acquises lors de la culture en continu de la souche *B. subtilis* ATCC 21332 dans notre procédé intégré, nous avons entrepris la culture de la souche BBG131 dans ce procédé. Cette étude nous a permis d'identifier les facteurs limitant les productivités en terme de biomasse et de surfactine. Contrairement au procédé précédemment étudié avec la souche *B. subtilis* ATCC 21332, le facteur limitant principalement cette culture semble être le substrat, bien que l'étude métabolique a aussi révélé une production mixte d'acide, dans certains conditions, qui pourrait résulter d'une possible limitation en oxygène.

---

A l'arrêt de ce procédé, près de 20 g M.S. de biomasse et plus de dix grammes de surfactine ont été produits en fonction des conditions testées. Si les résultats demeurent très satisfaisants pour la production de surfactine, ceux de la biomasse sont une fois de plus assez faibles pour un procédé où les cellules sont totalement recyclées. Comme nous l'avons déjà observé avec la souche ATCC 21332, ce paramètre devra faire l'objet d'une étude plus approfondie afin de pouvoir l'optimiser et ainsi augmenter encore plus la production des lipopeptides. L'apport d'une synthèse constitutive de la surfactine dans ce type de procédé n'a pas été clairement montré dans ces travaux, faute d'avoir eu le temps de comparer les productions obtenues avec la souche *B. subtilis* BBG131 à celles de sa souche mère. L'indépendance de cette synthèse vis-à-vis des conditions de croissance de la biomasse semble présenter un avantage certain lorsque la croissance est limitée. Par ailleurs, même si cette comparaison sera l'objet d'études ultérieures, il sera difficile de pouvoir quantifier et analyser les productions spécifiques de chaque souche. Ce paramètre est en effet indispensable pour mesurer l'effet de la synthèse constitutive par rapport à une synthèse native. La difficulté principale est de pouvoir quantifier la biomasse produite au cours du temps car une grande partie de celle-ci adhère sur les fibres creuses de la membrane d'oxygénation. Comme nous l'avons vu lors des expériences en batch avec *B. subtilis* ATCC 21332, cette quantité varie en fonction de la nature et de la surface de la membrane. Dès lors, on assiste toujours à la présence de deux populations bactériennes : la première, une apparente dans le bioréacteur et la seconde, non quantifiable au cours du procédé, adhérente à la surface des fibres creuses.

A l'issue de ce travail, les objectifs fixés dans le cadre de la thèse ont été atteints. La réalisation de ces objectifs a fait l'objet de travaux s'intégrant à la thématique du laboratoire ProBioGEM alliant les compétences du génie moléculaire et du génie des procédés pour la production sélective de peptides actifs. Les résultats de ces travaux ont ouvert le champ à d'autres investigations.

Citons à titre d'exemple, la compréhension à l'échelle moléculaire de l'influence des paramètres de culture tels que la température sur la synthèse des lipopeptides ; de l'effet synergique de la surfactine et de la plipastatine sur les propriétés antagonistes de *B. subtilis* ; de l'effet de la suppression de la production de la plipastatine sur la croissance invasive de la souche et la synthèse de surfactine ; du rôle joué par la séquence nucléotidique entre la région promotrice et le gène *srfAA* sur la production de surfactine.

D'autre part, les différents mutants obtenus peuvent être utilisés pour mieux comprendre le rôle joué par la surfactine et la plipastine *in vivo* dans différentes applications telles que la protection des plantes contre des phytopathogènes.

Les perspectives en génie des procédés sont aussi nombreuses. Comme nous l'avons vu précédemment, le procédé intégré mis en œuvre pour la production, l'extraction et la purification en continu des biosurfactants microbiens a montré des performances très intéressantes mais celles-ci doivent encore être comparées à celles d'un procédé continu ouvert. Par ailleurs, des techniques doivent être aussi développées pour limiter le colmatage des contacteurs air/liquide à membrane afin d'améliorer le transfert d'oxygène et permettre ainsi d'atteindre des productivités augmentées. Certains phénomènes physiologiques liés à la culture en continu de *B. subtilis* dans un bioréacteur, utilisant un contacteur air/liquide pour l'aération de la culture, restent encore à approfondir. C'est le cas notamment des mécanismes d'adhésion des cellules et des lipopeptides sur les différents types de membranes ; des voies métaboliques conduisant à la synthèse des acides organiques détectés dans les bioréacteurs à membrane ; du mécanisme d'induction de la production de plipastatine par *B. subtilis* ATCC21332 dans les réacteurs BB2 et BB3.

Ces travaux originaux ont illustré l'apport technologique des bioréacteurs à membrane pour la production, l'extraction et la purification en continu de biosurfactant microbien. Les performances du procédé intégré que nous avons mis en œuvre laissent entrevoir une industrialisation facile de cette production. Par ailleurs, les techniques de purification développées montrent une réelle efficacité de purification en limitant l'utilisation de solvant. Ces travaux s'inscrivent directement dans les efforts développés en matière d'environnement, car en plus de produire des molécules biologiques ayant un fort potentiel d'applications environnementales, les moyens de production étudiés dans ces travaux n'engendrent aucun rejet de produits chimiques polluants.

---

## **LISTE DES RÉFÉRENCES**

---

## A

Ahmed, T. and Semmens M.J. (1996) Use of transverse flow hollow fibers for bubbleless membrane aeration. *Water Res.* **30**: 440-446.

Arima, K., Kakinuma, A., and Tamura, G. (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**: 488-494.

## B

Bae, S.M., Park, Y.C., Lee, T.H., Kweon, D.H., Choi, J.H., Kim, S.K., Ryu, Y.W., and Seo, J.H. (2004) Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **35**: 545-549.

Banat, I.M. (2000) Les biosurfactants plus que jamais sollicités. *Biofutur* **198**.

Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J., and Ziessow, D. (1991) Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**: 998-1005.

Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa, J., Patarroyo, J.C., Aguilera, R., and Marquez-Magana, L.M. (2003) CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 3118-3126.

Berka, R.M., Hahn, J., Albano, M., Draskovic, I., Persuh, M., Cui, X., Sloma, A., Widner, W., and Dubnau, D. (2002) Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Mol. Microbiol.* **43**: 1331-1345.

Bertrand, J.C., Bonin, P., Goutx, M., Gauthier, M., and Mille, G. (1994) The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.* **145**: 53-56.

Bibal, B., Vayssier, Y., Goma, G., and Pareilleux, A. (1991) High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 746-754.

Bishop, D.G., Rutberg, L., and Samuelsson, B. (1967) The chemical composition of the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **2**: 448-453.

Bonmatin, J.M., Genest, M., Labbé, H., and Ptak, M. (1994) Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by 1H-NMR, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers* **34**: 975-986.

Bonmatin, J.M., Laprévote, O., and Peypoux, F. (2003) Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **6**: 541-556.

Bowen, W.R., Hall, N.J. (1995) Properties of microfiltration membranes: Mechanisms of flux loss in the recovery of an enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 28-35.

---

Boyaval, P., Lafforgue-Delorme, C., and Goma, G. (1998) *Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire*. Daufin, G., René, F., and Aimar, P. (eds). Paris : Lavoisier Tec & Doc.

Brindle, K., Stephenson, T. (1996) The application of membrane biological reactors for the treatment of wastewaters. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 601-610.

Brown, M.J. (1991) Biosurfactants for cosmetic applications. *Int.J.Cosmet.Sci.* **13**: 61-64.

Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T., and Stubbs, M.T. (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **10**: 301-310.

Byford, M.F., Baldwin, G.E., Shiau, C.Y. and Schofield, C.J. (1997) The mechanism of ACV synthetase. *Chem.Rev.* **97**, 2631-2649.

## C

Caboche, S., Pupin, M., Leclère, V., Fontaine, A., Jacques, P. and Kucherov, G. (2008) NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res.* **36**: 326-323

Caillon, J., Juvin, M.E., Pirault, J.L., and Drugeon, H.B. (1989) Bactericidal effect of daptomycin (LY 146032) compared with vancomycine and teicoplanin against gram-positive bacteria. *Pathol. Biol.(Paris)* **37**: 540-548.

Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J., and Ortiz, A. (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* **1611**: 91-97.

Chang, H.N., Furusaki, S. (1991) Membrane bioreactors: present and prospects. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **44**: 27-64.

Charcosset, C. (2006) Membrane processes in biotechnology: an overview. *Biotechnol. Adv.* **24**: 482-492.

Chen, H.L., Chen, Y.S., and Juang, R.S. (2007) Separation of surfactin from fermentation broths by acid precipitation and two-stage dead-end ultrafiltration processes. *J. Membr. Sci.* **299**: 114-121.

Chen, H.L., Juang, R.S. (2007) Extraction of surfactin from fermentation broth with n-hexane in microporous PVDF hollow fibers: Significance of membrane adsorption. *J. Membr. Sci.* **325**: 599-604.

Chen, H.L., Chen, Y.S., and Juang, R.S. (2008a) Flux decline and membrane cleaning in cross-flow ultrafiltration of treated fermentation broths for surfactin recovery. *Sep. Purif. Technol.* **62**: 47-55.

Chen, H.L., Chen, Y.S., and Juang, R.S. (2008b) Recovery of surfactin from fermentation broths by hybrid salting-out and filtration process. *Sep. Purif. Technol.* **59**: 244-252.

---

Chen, H.L., Juang, R.S. (2008) Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. *J. Biochem. Eng.* **38**: 39-46.

Choudhury, B., Swaminathan, T. (2006) Lactic acid fermentation in cell-recycle membrane bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **128**: 171-184.

Condon, C. (2003) RNA processing and degradation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 157-74.

Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J., and Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 408-412.

Copp, J.N., Neilan, B.A. (2006) The phosphopantetheinyl transferase superfamily: phylogenetic analysis and functional implications in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2298-2305.

Cosby, W.M., Zuber, P. (1997) Regulation of *Bacillus subtilis* sigmaH (*spo0H*) and AbrB in response to changes in external pH. *J. Bacteriol.* **179**: 6778-6787.

Cosby, W.M., Vollenbroich, D., Lee, O.H., and Zuber, P. (1998) Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *J. Bacteriol.* **180**: 1438-1445.

Cruz, R.H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D. (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* **182**: 3072-3080.

## D

Danner, H., Neureiter, M., Madzingaidzo, L., Gartner, M., and Braun, R. (1998) *Bacillus stearothermophilus* for thermophilic production of l-lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**: 895-903.

Daubert, I., Mercier-Bonin, M., Maranges, C., Goma, G., Fonade, C., and Lafforgue, C. (2003) Why and how membrane bioreactors with unsteady filtration conditions can improve the efficiency of biological processes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **984**: 420-435.

Davis, D.A., Lynch, H.C., and Varley, J. (1999) The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enz. Microb. Technol.* **25**: 322-329.

Davis, D.A., Lynch, H.C., and Varley, J. (2001) The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enz. Microb. Technol.* **28**: 346-354.

Deleu, M., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., Adriaensen, Y., and Dufrene, Y.F. (1999a) Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers. *Biophys. J.* **77**: 2304-2310.

---

Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., and Paquot, M. (1999b) Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces.A: Physicochemical and Engineering Aspects* **152**: 3-10.

Deleu, M., Bouffioux, O., Razafindralambo, H., Paquot, M., Hbid, C., Thonart, P., Jacques, P., and Brasseur, R. (2003) Interaction of surfactin with membranes: a computational approach. *Langmuir* **19**: 3377-3385.

Deleu, M., Paquot, M., and Nylander, T. (2005) Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **283**: 358-365.

Doan, T. (2003) Etude fonctionnelle du génome de *Bacillus subtilis* : de nouvelles régulations transcriptionnelles du métabolisme central du carbone. Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Doan, T., Aymerich, S. (2003) Regulation of the central glycolytic genes in *Bacillus subtilis*: binding of the repressor CggR to its single DNA target sequence is modulated by fructose-1,6-bisphosphate. *Mol. Microbiol.* **47**: 1709-1721.

Duitman, E.H., Hamoen, L.W., Rembold, M., Venema, G., Seitz, H., Saenger, W., Bernhard, F., Reinhardt, R., Schmidt, M., Ullrich, C., Stein, T., Leenders, F., and Vater, J. (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**: 13294-13299.

Duitman, E.H., Wyczawski, D., Boven, L.G., Venema, G., Kuipers, O.P., and Hamoen, L.W. (2007) Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 3490-3496.

## F

Faria, L.F., Pereira, N., Jr., and Nobrega, R. (2002) Xylitol production from D-xylose in amembrane bioreactor. *Desalination* **149**: 231-236.

Fickers, P., Leclère, V., Guez, J.S., Béchet, M., Coucheney, F., Joris, B., and Jacques, P. (2008) Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Res. Microbiol.* **159**: 449-457.

Fickers, P., Guez, J.S., Damblon, C., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., and Joris, B. (2009) High level biosynthesis of the mycosubtilin antibiotic anteiso-C17 isoform in *Bacillus subtilis* and characterisation of its candidacidal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* published online.

Fuhrer, T., Fischer, E., and Sauer, U. (2004) Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *J. Bacteriol.* **187**: 1581-1590.

---

## G

Gabelman, A. and Hwang, S.T. (1999) Hollow fiber membrane contactors. *J. Membr. Sci.* **159**: 61-106.

Gancel, F., Montastruc, L., Liu, T., Zhao, L., and Nikov, I. (2009) Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron-enriched light polymer particles. *Process Biochem.* doi:10.1016/j.procbio.2009.04.023.

Gehring, A.M., DeMoll, E., Fetherston, J.D., Mori, I., Mayhew, G.F., Blattner, F.R., Walsh, C.T., and Perry, R.D. (1998) Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. *Chem. Biol.* **5**: 573-586.

Gevers, W., Kleinkauf, H., and Lipmann, F. (1968) The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **60**: 269-276.

Grangemard, I., Peypoux, F., Wallach, J., Das, B.C., Labbé, H., Caille, A., Genest, M., Maget-Dana, R., Ptak, M., and Bonmatin, J.M. (1997) Lipopeptides with improved properties: structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins. *J. Pept. Sci.* **3**: 145-154.

Grossman, A.D. (1995) Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 477-508.

Grundy, F.J., Waters, D.A., Takova, T.Y., and Henkin, T.M. (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **10**: 259-271.

Guérout-Fleury, A.M., Frandsen, N., and Stragier, P. (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* **180**: 57-61.

Guez, J.S., Chenikher, S., Cassar, J.P., and Jacques, P. (2007) Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *J. Biotechnol.* **131**: 67-75.

Guez, J.S., Muller, C.H., Danzé, P.M., Buchs, J., and Jacques, P. (2008) Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *J. Biotechnol.* **134**: 121-126.

## H

Hamoen, L.W., Smits, W.K., de Jong, A., Holsappel, S., and Kuipers, O.P. (2002) Improving the predictive value of the competence transcription factor (ComK) binding site in *Bacillus subtilis* using a genomic approach. *Nucl. Acids Res.* **30**: 5517-5528.

Hamoen, L.W., Kausche, D., Marahiel, M.A., van Sinderen, D., Venema, G., and Serror, P. (2003a) The *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB binds to the -35 promoter region of comK. *FEMS Microbiol.Lett.* **218**: 299-304.

Hamoen, L.W., Venema, G., and Kuipers, O.P. (2003b) Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology* **149**: 9-17.

---

Hamze, K., Julkowska, D., Autret, S., Hinc, K., Nagorska, K., Sekowska, A., Holland, I.B., and Seror, S.J. (2009) Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for *phrC*. *Microbiology* **155**: 398-412.

Hayashi, K., Kensuke, T., Kobayashi, K., Ogasawara, N., and Ogura, M. (2006) *Bacillus subtilis* RghR (YvaN) represses *rapG* and *rapH*, which encode inhibitors of expression of the *urfA* operon. *Mol. Microbiol.* **59**: 1714-1729.

Hbid, C., Jacques, P., Razafindralambo, H., Mpoyo, M.K., Meurice, E., Paquot, M. and Thonart, P. (1996) Influence of the production of two lipopeptides, iturin A and surfactin S1, on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57-58, 571-579.

Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A., Leenders, F., Hitzeroth, G., and Vater, J. (2004) Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 363-378.

Holmes, D.S., Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197.

## I

Illing, N., Errington, J. (1990) The *spoIIIA* locus is not a major determinant of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **172**: 6930-6936.

Illing, N., Errington, J. (1991) The *spoIIIA* operon of *Bacillus subtilis* defines a new temporal class of mother-cell-specific sporulation genes under the control of the sigma E form of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **5**: 1927-1940.

Isa, M.H.M., Coraglia, D.E., Frazier, R.A., and Jauregi, P. (2007) Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. *J. Membr. Sci.* **296**: 51-57.

Ishigami, Y., Osman, M., Nakahara, H., Sano, Y., Ishiguro, R., and Matsumoto, M. (1995) Significance of beta-sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **4**: 341-348.

Itokawa, H., Miyashita, T., Morita, H., Takeya, K., Hirano, T., Homma, M., and Oka, K. (1994) Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7]surfactins from *Bacillus subtilis* natto. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **42**: 604-607.

## J

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E. and Thonart P. (1999) Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Butman design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77**: 223-233.

---

Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I.B., and Seror, S.J. (2004) Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of different cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology* **150**: 1839-1849.

Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I.B., and Seror, S.J. (2005) Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J. Bacteriol.* **187**: 65-76.

## K

Kaneda, T. (1967) Biosynthesis of long-chain hydrocarbons. I. Incorporation of L-valine, L-threonine, L-isoleucine, and L-leucine into specific branched-chain hydrocarbons in tobacco. *Biochemistry* **6**: 2023-2032.

Kaneda, T. (1968) Fatty acids in the genus *Bacillus*. II. Similarity in the fatty acid compositions of *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **95**: 2210-2216.

Kaneda, T., Smith, E.J. (1980) Relationship of primer specificity of fatty acid de novo synthetase to fatty acid composition in 10 species of bacteria and yeasts. *Can. J. Microbiol.* **26**: 893-898.

Karoor, S., Sirkar, K.K. (1993) Gas absorption studies in microporous hollow fiber membrane modules. *Ind. Eng. Chem. Res.* **32**: 674-684.

Kearns, D.B., Losick, R. (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **49**: 581-590.

Keating, T.A., Walsh, C.T. (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**: 598-606.

Keating, T.A., Marshall, C.G., and Walsh, C.T. (2000) Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry* **39**: 15513-15521.

Keggins, K.M., Lovett, P.S., Marrero, R., and Hoch, S.O. (1979) Insertional inactivation of *trpC* in cloned *Bacillus trp* segments: evidence for a polar effect on *trpF*. *J. Bacteriol.* **139**: 1001-1006.

Kell, H., Holzwarth, J.F., Boettcher, C., Heenan, R.K., and Vater, J. (2007) Physicochemical studies of the interaction of the lipoheptapeptide surfactin with lipid bilayers of L-alpha-dimyristoyl phosphatidylcholine. *Biophys. Chem.* **128**: 114-124.

Khoshbin, E., Westrope, C., Pooboni, S., Machin, D., Killer, H., Peek, G.J., Sosnowski, A.W., and Firmin, R.K. (2005) Performance of polymethyl pentene oxygenators for neonatal extracorporeal membrane oxygenation: a comparison with silicone membrane oxygenators. *Perfusion* **20**: 129-134.

Kinsinger, R.F., Shirk, M.C., and Fall, R. (2003) Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J. Bacteriol.* **185**: 5627-5631.

---

Kosaric, N. (2005) Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39**: 295-304.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A., and . al (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256.

Kwon, S.G., Park, S.W., and Oh, D.K. (2006) Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* **101**: 13-18.

## L

Lafforgue, C., Malinowski, J. and Goma, G. (1987) High yeast concentration in continous fermentation with cell recycle obtained by tangential microfiltration. *Biotechnol. Lett.* **9**: 347-352.

Lafforgue-Delorme, C., Stilhart, Y. and Goma, G. (1992) Nouveau procédé d'élaboration de boissons fermentées par culture continue en bioréacteur à membranes : cas du pétillant au raisin. *Sci. Aliments* **12**: 393-423.

Lafforgue-Delorme, C., Delorme, P. and Goma, G. (1994) Continuous alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* recycle by tangential filtration: key points for process modelling. *Biotechnol. Lett.* **16**: 741-746.

Lazazzera, B.A., Solomon, J.M., and Grossman, A.D. (1997) An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell* **89**: 917-925.

Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4577-4584.

Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., and Jacques, P. (2006) The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol.* **186**: 475-483.

Lee, B.S., Kim, E.K. (2008) Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enz. Microb. Technol.* **35**: 639-647.

Lee, C.W., Chang, H.N. (1987) Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 1105-1112.

Lee, Y.K., Kim, S.B., Park, C.S., Kim, J.G., Oh, H.M., Yoon, B.D., and Kim, H.S. (2005) Chromosomal integration of *sfp* gene in *Bacillus subtilis* to enhance bioavailability of hydrophobic liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 789-794.

---

Lesage, N., Sperandio, M., and Cabassud, C. (2005) Performances of a hybrid adsorption/submerged membrane biological process for toxic waste removal. *Water Sci. Technol.* **51**: 173-180.

Lin, H.J., Lu, X.F., Duan, W., and Shen, F. (2006) Filtration characteristics and mechanism of membrane fouling in a membrane bioreactor for municipal wastewater treatment. *Huan. Jing. Ke. Xue.* **27**: 2511-2517.

Lin, T.P., Chen, C.L., Chang, L.K., Tschen, J.S., and Liu, S.T. (1999) Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 5060-5067.

Liu, T., Montastruc, L., Gancel, F., Zhao, L., and Nikov, I. (2007) Integrated process for production of surfactin. Part 1: Adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon. *Biochem. Eng. J.* **35**: 333-340.

## M

Maamar, H., Dubnau, D. (2005) Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. *Mol. Microbiol.* **56**: 615-624.

Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., and Ptak, M. (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* **74**: 1047-1051.

Maget-Dana, R., Ptak, M. (1995) Interactions of surfactin with membrane models. *Biophys. J.* **68**: 1937-1943.

Majewska-Nowak, K., Kowalska, I., and Kabsch-Korbutowicz, M. (2005) Ultrafiltration of SDS solutions using polymeric membranes. *Desalination* **184**: 415-422.

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**: 2651-2674.

Maranges, C., Casanovas, C. and Lafforgue-Delorme, C. (1995) Crossflow filtration of *Saccharomyces cerevisiae* using an unsteady jet. *Biotechnol. Lett.* **9**: 649-654.

Marino, M., Hoffmann, T., Schmid, R., Mobitz, H., and Jahn, D. (2000) Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology* **146**: 97-105.

Marques, M.A., Citron, D.M., and Wang, C.C. (2007) Development of Tyrocidine A analogues with improved antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **15**: 6667-6677.

May, J.J., Wendrich, T.M., and Marahiel, M.A. (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J. Biol. Chem.* **276**: 7209-7217.

McGregor, W.C., Weaver, J.F., and Tansey, S.P. (1988) Antifoam effects on ultrafiltration. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 385-389.

---

Mercier, M., Maranges, C., Fonade, C., and Lafforgue-Delorme, C. (1998) Yeast suspension filtration: flux enhancement using an upward gas/liquid slug flow-application to continuous alcoholic fermentation with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 47-57.

Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.*

Montastruc, L., Liu, T., Gancel, F., Zhao, L., and Nikov, I. (2008) Integrated process for production of surfactin. Part 2: Equilibrium and kinetic study of surfactin adsorption onto activated carbon. *Biochem. Eng. J.* **38**: 349-354.

Mootz, H.D., Finking, R., and Marahiel, M.A. (2001) 4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **276**: 37289-37298.

Mootz, H.D., Schwarzer, D., and Marahiel, M.A. (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem.* **3**: 490-504.

Mossialos, D., Ochsner, U., Baysse, C., Chablain, P., Pirnay, J.P., Koedam, N., Budzikiewicz, H., Fernandez, D.U., Schafer, M., Ravel, J., and Cornelis, P. (2002) Identification of new, conserved, non-ribosomal peptide synthetases from fluorescent *pseudomonas* involved in the biosynthesis of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **45**: 1673-1685.

Mota, M., Besle, J.M., Strehaiano, P., and Goma, G. (1987) A simple device for fed-batch control in alcoholic fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 775-777.

Muller, W.E., Geisert, M., Zahn, R.K., Maidhof, A., Bachmann, M., and Umezawa, H. (1983) Potentiation of the cytostatic effect of bleomycin on L5178y mouse lymphoma cells by pepleomycin. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **19**: 665-670.

Mulligan, C.N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* **133**: 183-198.

## N

Nagata, N., Herouvis, K.J., Dziewulski, D.M. and Belfort, G. (1988) Cross-flow membrane microfiltration of a bacterial fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 447-449.

Nakamura, K., Matsumoto, K. (2006) Properties of protein adsorption onto pore surface during microfiltration: Effect of solution environment and membrane hydrophobicity. *J. Membr. Sci.* **280**: 363-374.

Nakano, M.M., Marahiel, M.A., and Zuber, P. (1988) Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **170**: 5662-5668.

Nakano, M.M., Zuber, P. (1989) Cloning and characterization of *srfB*, a regulatory gene involved in surfactin production and competence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **171**: 5347-5353.

---

Nakano, M.M., Xia, L.A., and Zuber, P. (1991) Transcription initiation region of the *srfA* operon, which is controlled by the *comP-comA* signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **173**: 5487-5493.

Nakano, M.M., Zuber, P. (1991) The primary role of *comA* in establishment of the competent state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of *srfA*. *J. Bacteriol.* **173**: 7269-7274.

Nakano, M.M., Zuber, P. (1993) Mutational analysis of the regulatory region of the *srfA* operon in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **175**: 3188-3191.

Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., and Clark, D.P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **179**: 6749-6755.

Nipkow, A., Zeikus, J.G., and Gerhardt, P. (1989) Microfiltration cell-recycle pilot system for continuous thermoanaerobic production of exo-beta-amylase. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 1075-1084.

## O

Ogura, M., Liu, L., Lacelle, M., Nakano, M.M., and Zuber, P. (1999) Mutational analysis of ComS: evidence for the interaction of ComS and MecA in the regulation of competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **32**: 799-812.

Ogura, M., Yamaguchi, H., Kobayashi, K., Ogasawara, N., Fujita, Y., and Tanaka, T. (2002) Whole-genome analysis of genes regulated by the *Bacillus subtilis* competence transcription factor ComK. *J. Bacteriol.* **184**: 2344-2351.

Ohno, A., Ano, T., and Shoda, M. (1995) Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 517-519.

Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A., and Thonart, P. (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 29-38.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., and Thonart, P. (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ. Microbiol.* **9**: 1084-1090.

Ongena, M., Jacques, P. (2008) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* **16**: 115-125.

Osman, M., Hoiland, H., Holmsen, H., and Ishigami, Y. (1998) Tuning micelles of a bioactive heptapeptide biosurfactant via extrinsically induced conformational transition of surfactin assembly. *J. Pept. Sci.* **4**: 449-458.

Oussenko, I.A., Abe, T., Ujiie, H., Muto, A., and Bechhofer, D.H. (2005) Participation of 3'-to-5' exoribonucleases in the turnover of *Bacillus subtilis* mRNA. *J. Bacteriol.* **187**: 2758-2767.

---

## P

Pankhania, M., Brindle, K., and Stephenson, T. (1999) Membrane aeration bioreactors for wastewater treatment: completely mixed and plug-flow operation. *Chem. Eng. J.* **73**: 131-136.

Park, E.Y. (2004) Recent progress in microbial cultivation techniques. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **90**: 1-33.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbé, H., Das, B.C., Ptak, M., and Michel, G. (1991) Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. *Eur. J. Biochem.* **202**: 101-106.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbé, H., Grangemard, I., Das, B.C., Ptak, M., Wallach, J., and Michel, G. (1994) [Ala4]surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *Eur. J. Biochem.* **224**: 89-96.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 553-563.

Pirt, J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific. *Publication* .

Pollet, S., Guigui, C., and Cabassud, C. (2008) Fouling and its reversibility in relation to flow properties and module design in aerated hollow fibre modules for membrane bioreactors. *Water Sci. Technol.* **57**: 629-636.

## Q

Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P., and Walsh, C.T. (1998) Characterization of *Sfp*, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **37**: 1585-1595.

## R

Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P., and Thonart, P. (1996) Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *JAACS* **73**: 149-151.

Remize, P.J. and Cabassud, C. (2003) Un nouveau réacteur d'oxydation sans bulles : le contacteur à membrane G/L. Récents progrès en génie des procédés. Intégration des membranes dans les procédés 2. Lavoisier Tec et Doc.

Ryffel, B., Weber, E., and Mihatsch, M.J. (1994) Nephrotoxicity of immunosuppressants in rats: comparison of macrolides with cyclosporin. *Exp. Nephrol.* **2**: 324-333.

## S

Salgin, S., Takac, S., and Ozdamar, T.H. (2006) Effect of ionic environments on the adsorption and diffusion characteristics of serine alkaline protease enzyme in polyethersulfone ultrafiltration membranes. *J. Colloid Interface Sci.* **299**: 806-814.

---

Sambrook, J., Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3<sup>rd</sup> ed. *Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory*.

Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A., and Essen, L.O. (2006) The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J. Mol. Biol.* **359**: 876-889.

Schneider, M., Reymond, F., Marison, U., and von Stockar, U. (1995) Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. *Enz. Microb. Technol.* **17**: 839-837.

Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M.A. (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**: 275-287.

Sen, R., Swaminathan, T. (2005) Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for small-scale recovery of surfactin. *Process Biochem.* **40**: 2953-2958.

Serror, P., Sonenshein, A.L. (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J. Bacteriol.* **178**: 5910-5915.

Shakerifard, P., Gancel, F., Jacques, P., and Faille, C. (2009) Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity and adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling* **25**: 533-541.

Shen, H.H., Thomas, R.K., Chen, C.Y., Darton, R.C., Baker, S.C., and Penfold, J. (2009) Aggregation of the naturally occurring lipopeptide, surfactin, at interfaces and in solution: An unusual type of surfactant? *Langmuir*.

Sheng, X.F., He, L.Y. (2006) Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. *Can. J. Microbiol.* **52**: 66-72.

Sieber, S.A., Marahiel, M.A. (2005) Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem. Rev.* **105**: 715-738.

Simakova, I.M., Kharatian, E.F., Vostroknutova, G.N., Bulgakova, V.G., and Udalova, T.P. (1985) Organization and chemical composition of the cell wall of gramicidin S-producing *Bacillus brevis*. *Mikrobiologiya* **54**: 73-82.

Smith, S. (2002) Modular NRPSs are monomeric. *Chem. Biol.* **9**: 955-956.

Solomon, J.M., Lazazzera, B.A., and Grossman, A.D. (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* **10**: 2014-2024.

Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (2002) *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology and molecular genetic*.

Song, C.S., Ye, R.Q., and Mu, B.Z. (2007) Molecular behaviour of a microbial lipopeptide monolayer at the air-water interface. *Colloids and Surfaces. A: Physicochem. Eng. Aspects* **302**: 82-87.

---

Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M., and Garcia, A.F. (2004) Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 1247-1256.

Steller, S., Sokoll, A., Wilde, C., Bernhard, F., Franke, P., and Vater, J. (2004) Initiation of surfactin biosynthesis and the role of the SrfD-thioesterase protein. *Biochemistry* **43**: 11331-11343.

Sterlini, J.M., Mandelstam, J. (1969) Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to development of actinomycin resistance. *Biochem. J.* **113**: 29-37.

## T

Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C., and Julien, B. (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* **287**: 640-642.

Tannler, S., Decasper, S., and Sauer, U. (2008) Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. *Microb. Cell Fact.* **7**: 19.

Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., and Michel, G. (1992) Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **16**: 144-151.

Tomino, S., Yamada, M., Itoh, H., and Kurahashik (1967) Cell-free synthesis of gramicidin S. *Biochemistry* **6**: 2552-2560.

Trible, L.A., Briens, C.L., and Margaritis, A.A. (1995) Determination of the volumetric mass transfer coefficient using dynamic "Gas Out-Gas In" method: analysis of errors caused by dissolved oxygen probe. *Biotechnol. Bioeng.* **46**: 388-392.

Trischman, J.A., Jensen, P.R. and Fnical, W. Halobacillin. (1994) A cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Lett.* **35**, 5571-5574.

Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M. (1999) The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8* (*sfp*) are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2183-2192.

Tsuge, K., Akiyama, T., and Shoda, M. (2001a) Cloning, sequencing, and characterization of the iturin A operon. *J. Bacteriol.* **183**: 6265-6273.

Tsuge, K., Ohata, Y., and Shoda, M. (2001b) Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3566-3573.

## U et V

UribeArrea, J.L., De Queiroz, H., Goma, G., and Pareilleux, A. (1993) Carbon and energy balances in cell-recycle cultures of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 729-736.

---

Van Sinderen, D., Venema, G. (1994) *comK* acts as an autoregulatory control switch in the signal transduction route to competence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**: 5762-5770.

Van Sinderen, D., Luttinger, A., Kong, L., Dubnau, D., Venema, G., and Hamoen, L. (1995) *comK* encodes the competence transcription factor, the key regulatory protein for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **15**: 455-462.

Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R.M., and Pauli, G. (1997a) Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* **25**: 289-297.

Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., and Vater, J. (1997b) Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 44-49.

Von Dohren, H., Keller, U., Vater, J., and Zocher, R. (1997) Multifunctional Peptide Synthetases. *Chem. Rev.* **97**: 2675-2706.

Von Weymarn, N., Kiviharju, K., and Leisola, M. (2002) High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 44-49.

Wang, R., Zhang, H.Y., Feron, P.H.M., and Liang, D.T. (2005) Influence of membrane wetting on CO<sub>2</sub> capture in microporous hollow fiber membrane contactors. *Sep. Purif. Technol.* **46**: 33-40.

## W, X, Y et Z

Weckermann, R., Furbass, R., and Marahiel, M.A. (1988) Complete nucleotide sequence of the *tycA* gene coding the tyrocidine synthetase 1 from *Bacillus brevis*. *Nucl. Acids Res.* **16**: 11841.

Wei, C., Huang, X., and Wen, X. (2006) Pilot study on municipal wastewater treatment by a modified submerged membrane bioreactor. *Water Sci. Technol.* **53**: 103-110.

Wei, Y.H., Wang, L.F., and Chang, J.S. (2004) Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* **20**: 979-983.

Xavier, A.M., Goncalves, L.M., Moreira, J.L., and Carrondo, M.J. (1995) Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **45**: 320-327.

Yeh, M.S., Wei, Y.H. and Chang, J.S. (2006) Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* **41**: 1799-1805.

Zeigler, D.R., Pragai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Bai, R., Wyss, M., and Perkins, J.B. (2008) The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains *J. Bacteriol.* **190**: 6983-6995.

Zhang, G., Ji, S., Gao, X., and Liu, Z. (2008) Adsorptive fouling of extracellular polymeric substances with polymeric ultrafiltration membranes *J. Membr. Sci.* **309**: 28-35.

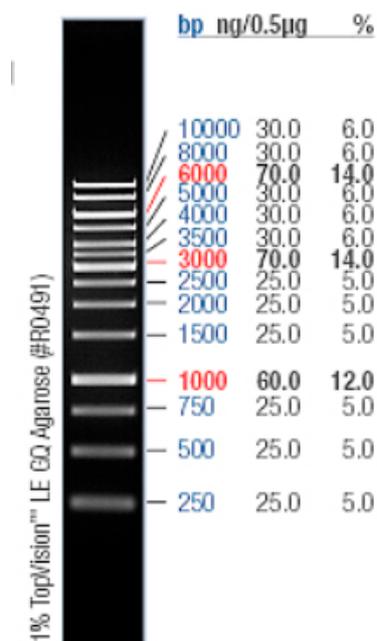
---

# **ANNEXES**

## ANNEXE I

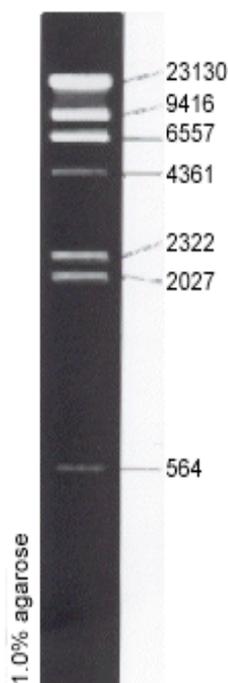
Représentation et description des marqueurs de poids moléculaire utilisés dans ces travaux

### *O'Gene Ruler*

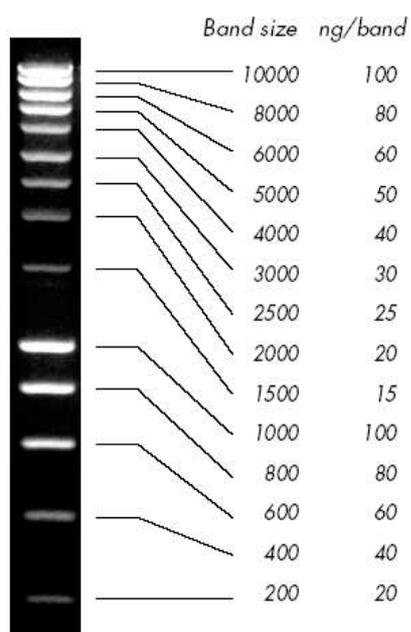


0.5µg/lane, 8cm length gel,  
1X TAE, 7V/cm, 45min

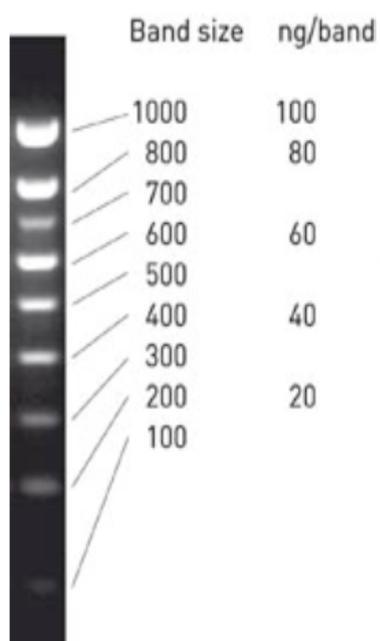
### $\lambda$ *hindIII*



### *SmartLadder*

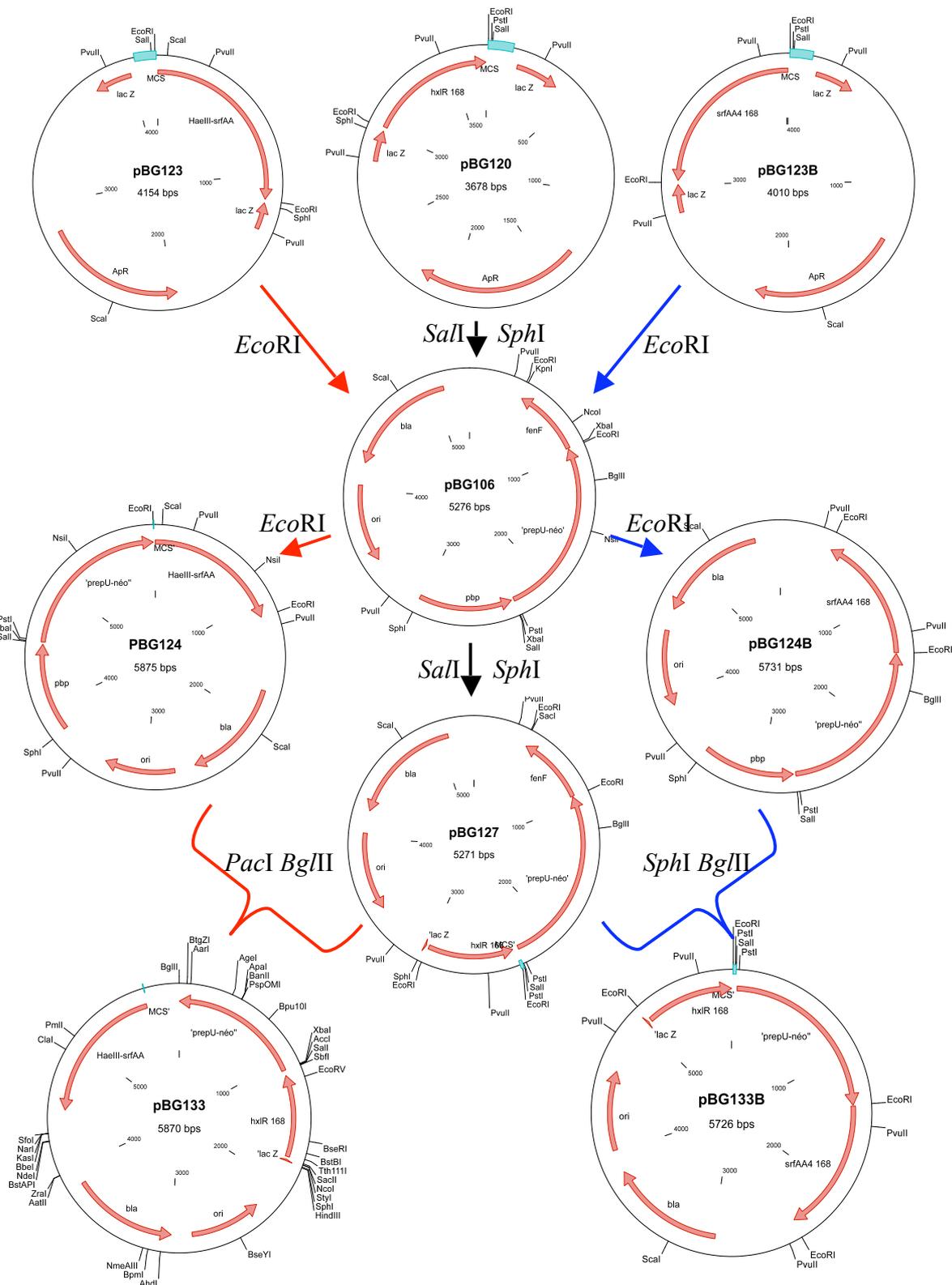


### *SmartLadder SF*



## ANNEXE II

Organigramme des constructions génétiques conduisant à la formation du plasmide ayant permis le remplacement du promoteur  $P_{srfA}$  chez *B. subtilis*.



## ANNEXE III

Arch Microbiol  
DOI 10.1007/s00203-009-0487-6

SHORT COMMUNICATION

### Resistance of the cell wall to degradation is a critical parameter for isolation of high quality RNA from natural isolates of *Bacillus subtilis*

Jean-Sébastien Guez · François Coutte ·  
Anne-Sophie Drucbert · Nour-Eddine Chihib ·  
Pierre-Marie Danzé · Philippe Jacques

Received: 20 February 2009 / Accepted: 25 May 2009  
© Springer-Verlag 2009

**Abstract** Natural isolates of *Bacillus subtilis* are known for their ability to produce a large panel of bioactive compounds. Unfortunately, their recalcitrance to conventional molecular techniques limits their transcript studies. In this work, difficulties to isolate RNA attributed to the cell wall were overcome, finally authorising powerful RT-PCR's.

**Keywords** RNA isolation · *Bacillus subtilis* · Natural strain · Cell wall · Transcript analysis · RT-PCR

The endospore-forming bacterium *Bacillus subtilis* ATCC 6633 is a natural isolate with a high potential of peptide antibiotic production, whether of ribosomal origin, as subtilin (Leenders et al. 1999) and subtilosin (Stein et al. 2004), or of non-ribosomal origin, as rhizocitin, mycosubtilin and surfactin (Duitman et al. 1999; Leclère et al. 2005). Most of these peptides are not produced by the reference laboratory strain *B. subtilis* 168 (Zeigler et al. 2008). Regulation studies of the biosynthesis of such compounds have to be made in *B. subtilis* ATCC6633. A counterpart is the recalcitrance of this isolate to molecular techniques like genetic transformations (Duitman et al. 2007; Leclère et al. 2005) or transcript analysis requiring hence RNA extraction.

Owing to the different characteristics of the cell wall structure and composition, the isolation of high quality RNA from gram-positive organisms is known to be more difficult than for gram-negative ones. There are many methods for disrupting gram-positive cell walls for RNA isolation purposes. These methods can act enzymatically through a lysozyme and proteinase K treatment or chemically with homogenisation of the cells in a lysis buffer (Van Dessel et al. 2004). They can also act mechanically through the use of violently agitated zirconia-silica beads (Hambraeus et al. 2003; Moeller et al. 2006) or glass beads (Putzer et al. 1992; Oh and So 2003). In a preliminary work (data not shown), such routine techniques for cell lysis in the RNA isolation protocol were efficient for *B. subtilis* 168 Marburg but not for the natural strain *B. subtilis* ATCC 6633.

To analyse the cell wall resistance to degradation, the kinetics of protoplast generation of both strains were compared. They were grown in Erlenmeyer flasks at 30°C and 160 rpm in a modified Landy medium (Guez et al. 2007) buffered with MOPS [3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, Sigma-Aldrich, France] 100 mM, pH 7.0, supplemented with tryptophan, 16 mg/l. Before inoculation, the precultures were centrifuged and washed in 9 g/l NaCl solution. The initial optical density of the culture was between 0.05 and 0.1 OD units, measured at 600 nm using an Uvicon 922 spectrophotometer (Kontron, Germany). Protoplast generation kinetics was obtained using a previously described protocol (Errington 1990). For cells sampled at 1 OD unit, corresponding to the early exponential growth, complete protoplast formation was obtained with *B. subtilis* 168 after 30 min of incubation in the SMPP buffer added with 2 mg/ml lysozyme, whereas a partial protoplasm formation rate was obtained with *B. subtilis* ATCC 6633, 83% after 30 min and 93% after 60 min of incubation

Communicated by Erko Stackebrandt.

J.-S. Guez (✉) · F. Coutte · N.-E. Chihib · P. Jacques  
Laboratoire ProBioGEM, UPRES-EA 1026, Polytech-Lille,  
IUT A, Université des Sciences et Technologies de Lille,  
Bd Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France  
e-mail: jean-sebastien.guez@polytech-lille.fr

A.-S. Drucbert · P.-M. Danzé  
Faculté de Médecine H. Warembourg,  
IFR114-IMPRT (functional genomic platform),  
Place de Verdun, 59045 Lille, France

Published online: 12 June 2009

 Springer

**Table 1** Evolution of the protoplast formation rate expressed in % after 30 and 60 min of incubation in the SMPP buffer added with 2 mg/ml of lysozyme

	<i>B. subtilis</i> 168		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	
	Early growth	Middle-late growth	Early growth	Middle-late growth
Protoplast formation rate after 30 min (%)	>99	70 ± 1	83 ± 4	43 ± 4
Protoplast formation rate after 60 min (%)	>99	82 ± 3	93 ± 4	59 ± 1

Samples were taken at the stage of early and middle-late exponential growth during cultures of *B. subtilis* 168 and ATCC 6633 in the modified Landy medium. Standard deviations were calculated at least on a duplicate set of cultures

(Table 1). For cells sampled at 5 OD unit, corresponding to the middle-late exponential growth, a higher partial protoplast formation rate was obtained with *B. subtilis* 168, 70% after 30 min and 82% after 60 min, whereas a more partial one was obtained with *B. subtilis* ATCC 6633, 43% after 30 min and 59% after 60 min. This experiment showed the lower protoplast formation rates obtained with *B. subtilis* ATCC 6633 compared to *B. subtilis* 168.

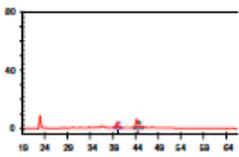
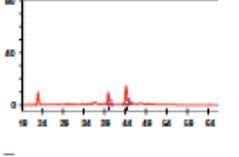
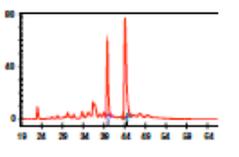
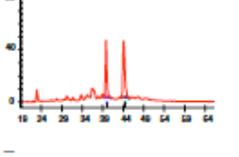
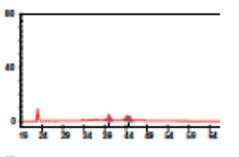
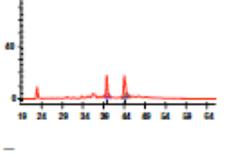
Taking into account this information, some modifications of the Ribopure (Ambion, Germany) procedure for RNA isolation from *B. subtilis* ATCC 6633 were experimented. A volume corresponding to  $5 \times 10^8$  cells was sampled on cultures and immediately added to the RNALater ice-cold solution (v/v) for rapid RNase inactivation, mixed during 10 s and centrifuged 5 min at  $-9^\circ\text{C}$  and  $11,000 \times g$ . The supernatant was discarded and the pellet stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The defrozen cells were then resuspended in 50  $\mu\text{l}$  of a buffer solution and treated with lysozyme (Table 2) (10 mg/ml, Sigma-Aldrich). Different incubation conditions in the lysozyme solution were tested, 0, 10 or 30 min, at room temperature. It should be noted that incubation with lysozyme at  $37^\circ\text{C}$  was not recommended because of extensive shearing of RNA. A volume of 350  $\mu\text{l}$  of RNAWiz phenolic solution (RiboPure Bacteria, Ambion) was added and a mechanical cell lysis in the presence of 250  $\mu\text{l}$  of zirconia beads was performed for 0, 10 or 30 min at high speed using a vortex adapter. The lysate was then centrifuged 5 min at  $12,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$ . The beads were discarded and 0.2 vol of chloroform added. The mixture was shaken for 30 s, incubated 10 min at room temperature and centrifuged 5 min at  $12,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$ . The aqueous phase was then retrieved and 0.5 volume of ethanol added. Purification of RNA was completed on glass-fibre using the RiboPure protocol. An additional DNase treatment was performed adding 5.5  $\mu\text{l}$  of  $10 \times$  DNase buffer (Ambion) and 4  $\mu\text{l}$  of DNase (Ambion) followed by 30 min incubation at  $37^\circ\text{C}$ . The solution was then mixed with 10  $\mu\text{l}$  of the inactivation reagent, incubated 2 min at room temperature, centrifuged 1 min at  $12,000 \times g$  and the supernatant was stored in a tube. The total quantity of RNA was measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Agilent, USA). The RNA 23S/16S ratio (RNA 6000 NanoAssay, 2100

Bioanalyzer, Agilent) and the electropherograms were used as a quality indicator of RNA. Electrophoresis was performed in non-denaturing conditions (Jahn et al. 2008). As the use of the RIN (RNA integrity number) cannot be formally performed for prokaryotes yet (Schroeder et al. 2007), the electropherograms were analysed with giving importance to the baselines of the fast region and of the ribosomal inter-region, which are critical for assessing quality of RNA. The protein contamination was estimated by measuring the  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  ratio (Nanodrop ND-1000).

Compared to the very low RNA extraction yield of 0.3  $\mu\text{g}$  obtained in the absence of lysozyme, its presence allowed, in some cases, a better RNA extraction (Table 2). In the absence of incubation, the low yields of 2.3 and 4.5  $\mu\text{g}$  were obtained because of insufficient cell wall degradation. Nevertheless, the value of the 23S/16S ratio between 1.83 and 1.98 showed the good quality of the RNA. With an incubation time of 30 min in lysozyme, the low RNA yields of 3.4 and 5.7  $\mu\text{g}$  were probably obtained because of extensive RNA degradation which is confirmed by the low 23S/16S ratio of 1.04 and 1.32. With an incubation time of 10 min in lysozyme, RNA extraction yielded 13.5 and 15.0  $\mu\text{g}$ . For this latter condition, the quality of RNA was better when agitating for 10 min in the presence of zirconia beads, 23S/16S ratio of 1.71, than for 30 min, 23S/16S ratio of 1.24. The gels presented the absence of smears (data not shown) and electropherograms showed the absence of deviation of the baseline, especially for the segments of the fast region and the ribosomal inter-region. According to the criteria developed previously by authors (Schroeder et al. 2006), the extracted RNA would belong to the RNA integrity categories 7 or 8, corresponding to minor RNA degradation. It is to be noticed that RIN values above 7 are considered as sufficient values for further transcript analysis (Jahn et al. 2008).

With such a protocol, comparative RNA isolations were then performed on culture samples from *B. subtilis* ATCC 6633 and 168 taken after 4, 6 and 7 generations which corresponded to the middle and late exponential growth phase (Fig. 1). The RNA-specific extraction yields expressed in  $\mu\text{g}$  of RNA per  $10^8$  cells were lower for *B. subtilis* ATCC

**Table 2** RNA isolation yield ( $\mu\text{g}$ ), purity analysis ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  ratio), and quality indicator (electropherograms, 23S/16S ratio,) obtained with *B. subtilis* ATCC 6633 ( $5 \times 10^8$  cells/ml) for different lysozyme incubation conditions (0, 10 and 30 min) and for different agitation times (0, 10 and 30 min) in the presence of zirconia beads

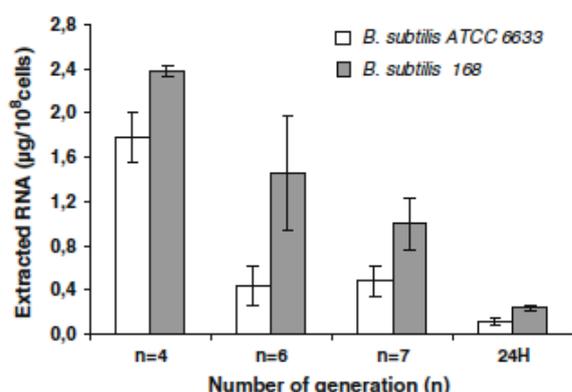
Experimental conditions		RNA yield ( $\mu\text{g}$ )	$A_{260}/A_{280}$ ratio	Electropherogram	23S/16S ratio
Incubation time in lysozyme	Agitation time in the presence of zirconia beads				
No incubation	No agitation	<0.1	—	—	—
	10 min	$2.3 \pm 1.2$	$2.07 \pm 0.03$		$1.98 \pm 0.15$
	30 min	$4.5 \pm 1.5$	$2.08 \pm 0.02$		$1.83 \pm 0.12$
10 min	No agitation	<0.1	—	—	—
	10 min	$15.0 \pm 0.9$	$2.13 \pm 0.02$		$1.71 \pm 0.06$
	30 min	$13.5 \pm 0.2$	$2.14 \pm 0.01$		$1.24 \pm 0.11$
30 min	No agitation	<0.1	—	—	—
	10 min	$3.4 \pm 0.8$	$2.11 \pm 0.03$		$1.04 \pm 0.20$
	30 min	$5.7 \pm 1.3$	$2.12 \pm 0.01$		$1.32 \pm 0.08$
No lysozyme added*	10 min	$0.3 \pm 0.1$	—	—	—

Lysozyme at 10 mg/ml was added prior to the RNA isolation protocol. Standard deviations were calculated on a duplicate set of analysis. Electropherograms are representative of a duplicate set of analysis

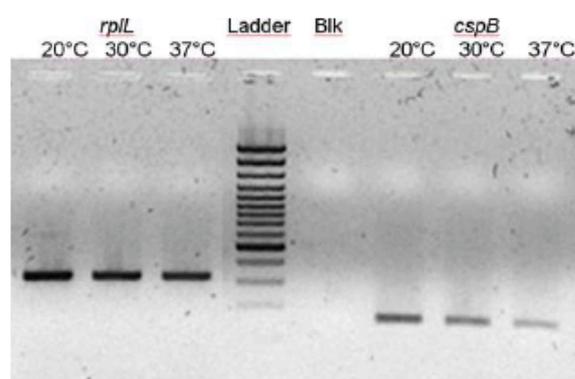
\* Ambion Ribopure reference protocol

6633, ranging from 1.8 to 0.11 according to the sampling time, compared to *B. subtilis* 168, ranging from 2.4 to 0.23. The lowest yields for both strains corresponded to samples taken at 24 h, i.e. during the stringent response, which is a well-known phenomenon. Interestingly, the evolution of these yields for increasing generation numbers also showed a greater drop for *B. subtilis* ATCC 6633, observed after 6 and 7 generations, compared to *B. subtilis* 168. These

results globally showed the efficiency of the RNA isolation method for early growing cells and the increased difficulty in isolating RNA from late-growing cells, independently from the ecological origin of the cells. They particularly confirm the recalcitrance of *B. subtilis* ATCC 6633 to molecular techniques (Duitman et al. 2007), which is caused by the cell wall being subjected to different dynamic structural and biochemical modifications.



**Fig. 1** RNA-specific extraction yields ( $\mu\text{g}$  of RNA per  $10^8$  cells) from *B. subtilis* ATCC 6633 and 168 cultivated in the modified Landy medium for a number of generations of 4, 6 or 7 or for a time of 24 h. Standard deviations were calculated on a triplicate set of cultures



**Fig. 2** Comparative RT-PCR gel of *rplL* and *cspB* genes from *B. subtilis* ATCC 6633. Samples were prepared from growths obtained in flasks at different temperatures 20, 30 and 37°C. The culture medium was the modified Landy medium buffered with MOPS 100 mM at pH 7.0

A transcript analysis was finally performed to confirm the high quality of RNAs prepared from *B. subtilis* ATCC 6633. The expression of *cspB* gene coding for a major cold shock protein was done on cells sampled on cultures made at different temperatures. The semi-quantitative measurement of *cspB* transcripts was done by RT-PCR following the method presented previously by authors (Guez et al. 2008). RT-PCR were done with 3  $\mu\text{g}$  of prepared RNAs. To estimate the level of expression of the *csp* gene coding for the major cold shock protein, a 154 bp PCR product belonging to the *csp* locus was amplified using the following pair of oligonucleotides: 5'-AAAAGGTTTCGGATT CATCG-3' and 5'-AACGTTAGCAGCTTGTGGTC-3'. It was verified that the expression of *rplL*, a housekeeping gene of *B. subtilis* coding for the ribosomal protein L12, remained constant for each sample. RT-PCR results of *cspB*

gene expression for cultures made at 20, 30 and 37°C are shown on Fig. 2. As the level of expression of *cspB* increased drastically with decreasing the temperature of the cultures, which was the expected physiological response (Willimsky et al. 1992), this RNA isolation method was found to be particularly well suited for an example of transcript analysis and could be very useful for further work enabling larger gene expression studies of natural isolates of *B. subtilis*.

**Acknowledgments** This work received the financial support from the Université des Sciences et Technologies de Lille (BQR), the Agence Nationale de la Recherche (ANR) and the European Funds for the Regional Development. Authors wanted to thank Dr W. Everett for kind re-reading.

## References

- Duitman EH, Hamoen LW, Rembold M, Venema G, Seitz H, Saenger W, Bernhard F, Reinhardt R, Schmidt M, Ullrich C, Stein T, Leenders F, Vater J (1999) The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: a multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. *Proc Natl Acad Sci* 96(23):13294–13299
- Duitman EH, Wyczawski D, Boven LG, Venema G, Kuipers OP, Hamoen LW (2007) Novel methods for genetic transformation of natural *Bacillus subtilis* isolates used to study the regulation of the mycosubtilin and surfactin synthetases. *Appl Environ Microbiol* 73:3490–3496
- Errington J (1990) Gene cloning techniques. In: Harwood CR, Cutting SM (eds) *Molecular biological methods for Bacillus*. Wiley, Chichester, pp 175–220
- Guez JS, Chenikher S, Cassar JP, Jacques P (2007) Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *J Biotechnol* 131:67–75
- Guez JS, Muller CH, Büchs J, Jacques P (2008) Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *J Biotechnol* 134(1–2):121–126
- Hambraeus G, von Wachenfeldt C, Hederstedt L (2003) Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs. *Mol Genet Genomics* 269:706–714
- Jahn CE, Charkowski AO, Willis DK (2008) Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J Microbiol Methods* 75(2):318–324
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathélet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P (2005) Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Appl Environ Microbiol* 71:4577–4584
- Leenders F, Stein TH, Kablitz B, Franke P, Vater J (1999) Rapid typing of *Bacillus subtilis* strains by their secondary metabolites using matrix assisted laser-desorption/ionization mass spectrometry of intact cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* 13:943–949
- Moeller R, Horneck G, Rettberg P, Mollenkopf HJ, Stackebrandt E, Nicholson WL (2006) A method for extracting RNA from dormant and germinating *Bacillus subtilis* strain 168 endospores. *Curr Microbiol* 53:227–231
- Oh ET, So JS (2003) A rapid method for RNA preparation from Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods* 52:395–398

- Putzer H, Gendron N, Grunberg-Manago M (1992) Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J* 11:3117–3127
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7(3)
- Stein T, Dusterhus S, Stroh A, Entian KD (2004) Subtilisin production by two *Bacillus subtilis* subspecies and variance of the *sbo-alb* cluster. *Appl Environ Microbiol* 70:2349–2353
- Van Dessel W, Van Mellaert L, Geukens N, Lammertyn E, Anne J (2004) Isolation of high quality RNA from *Streptomyces*. *J Microbiol Methods* 58:135–137
- Willimsky G, Bang H, Fisher G, Marahiel MA (1992) Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. *J Bacteriol* 174(20):6326–6335
- Zeigler DR, Prágai Z, Rodríguez S, Chevreux B, Muffler A, Albert T, Bai R, Wyss M, Perkins JB (2008) The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *J Bacteriol* 190(21):6983–6995