

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



جامعة ابو بكر بلقايد_ تلمسان



كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الأرض و الكون

Faculté des Science de la Nature et de la Vie, et Science de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MÉMOIRE

Présenté par

Boukhabia Zineb et Hammoudi Fatima Zohra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie Fondamentale

Thème

**Production d'exopolysaccharides par des souches de
*Bacillus thermophiles***

Soutenu le 29/06/2022 Devant le jury composé de:

Présidente	Mme Bellifa Samia	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Ayad Amel	MCB	Université de Tlemcen
Encadrante	Mme Klouche Nihel	Professeur	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Nous tenons à remercier tout d'abord Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la patience, la volonté pour mener à terme ce travail

Nous exprimons tous nos remerciements à l'ensemble des membres de notre jury qui nous ont fait l'honneur de juger ce mémoire :

Mde Bellifa Samia présidente de jury.

Mde Ayad Amel examinatrice.

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à notre encadrante Pr. Klouche Nihel, pour sa gentillesse, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa contribution à l'élaboration de ce travail

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

*Mes chers parents **Ahmed et Djamila**, que nulle dédicace ne
puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée,
leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon
profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*A mes chères frères et sœurs : **Mohammed, Khalil, Mounia et
Meriem***

*A toutes mes cousins et cousines et toute ma famille **Boukhabia et
Khelfoun***

Aucun mot ne pourra décrire vos dévouements et vos sacrifices.

*Je dédie également ce travail à ma grand-mère **Aïcha**, qui
m'a tant soutenu*

*Et aussi à mon binôme et chère copine, **Hammoudi Fatima
Zohra**, avec qui j'ai passé les moments les plus beaux et sans qui
ce travail ne serait pas possible*

*Enfin, à tous mes amies, qui m'ont encouragé tout le long de
cette période*

Zineb

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à

Mes chers parents Mohammed et Yamina que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices

A mes chères frères et sœurs : Amine, Hayate, Khalida, Sara et Amira

A toutes mes cousins et cousines et toute ma famille Hammoudi et Ben Abdallah

Aucun mot ne pourra décrire vos dévouements et vos sacrifices.

Et aussi à mon binôme et chère copine, Boukhabia Zineb, avec qui j'ai passé les moments les plus beaux et sans qui ce travail ne serait pas possible

Enfin, à tous mes amies, qui m'ont encouragé tout le long de cette période

Fatima Zohra

Résumé

Résumé

Les *Bacillus* thermophiles ont la capacité de produire différents types d'exopolysaccharides (EPS) présentant une grande diversité de structures. Ces exopolysaccharides peuvent être de nature homopolysaccharide ou hétéropolysaccharide. Les EPS de *Bacillus* thermophiles ont largement attiré l'attention en raison de leurs avantages tels qu'un temps de fermentation court, une diminution de la viscosité du polymère synthétisé et de la culture correspondante et de la nature non toxique du polymère permettant des applications dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Le glucose et le saccharose sont les sources de carbone les plus couramment utilisées pour la production d'EPS. Des grandes valeurs de productivité ont été signalées pour la production d'EPS par les souches de *Bacillus* thermophiles tels que *Geobacillus sp.* WSUCF, il a été démontré que la production des EPS par cette souche donne un rendement allant jusqu'à 526 mg/L à ($T^{\circ}= 60^{\circ}\text{C}$, pH 7,0 ; glucose, 6,0 g/L ; de l'extrait de levure, 1,0 g/L et du NaCl, 3,0 g/L).

Mots clés : *Bacillus* thermophiles, Exopolysaccharides, les techniques de production

Abstract

The thermophilic *Bacillus* have the ability to produce different types of exopolysaccharides (EPS) with a wide diversity of structures. These exopolysaccharides can be homopolysaccharide or heteropolysaccharide. The thermophilic *Bacillus* EPS have greatly drawn attention due to their advantages such as short fermentation time, a decrease in the viscosity of the synthesized polymer and the corresponding culture and the non-toxic nature of the polymer allowing applications in the food and pharmaceutical fields. Glucose and sucrose are the most commonly used carbon sources for EPS production. High productivity values have been reported for EPS production by thermophilic *Bacillus* strains such as *Geobacillus sp.* WSUCF, EPS production by this strain has been shown to yield up to 526 mg/L at ($T^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, glucose, 6.0 g/L, of the yeast extract, 1.0 g/L and NaCl, 3.0 g/L).

Keywords : Thermophilic *Bacillus*, Exopolysaccharides, production technics.

ملخص

Bacillus المحبة للحرارة لديها القدرة على إنتاج أنواع مختلفة من عديدات السكاريد الخارجية (EPS) مع مجموعة متنوعة من الهياكل. يمكن أن تكون عديدات السكاريد الخارجية متجانسة أو غير متجانسة. حظيت (EPS) المنتجة من طرف *Bacillus* المحبة للحرارة باهتمام واسع نظرا لمزاياها مثل وقت التخمر القصير و انخفاض لزوجة البوليمير المركب و الطبيعية غير السامة للبوليمير التي تسمح بالتطبيقات في المجالات الغذائية و الصيدلانية . الجلوكوز و السكرز هما اكثر مصادر الكربون استخداما لإنتاج (EPS). تم الإبلاغ عن قيم إنتاجية عالية لإنتاج (EPS) بواسطة سلالات *Bacillus* المحبة للحرارة مثل *Geobacillus sp. WSUCF*. لقد ثبت أن إنتاج (EPS) بهذه السلالة ينتج عنه ما يصل الى 526 ملغ/ل عند ($T^{\circ}=60^{\circ}C$ ، $pH=7$ ، الجلوكوز 6,0 غ/ل، مستخلص الخميرة 1,0 غ/ل و 3,0 NaCl غ/ل).

الكلمات المفتاحية : *Bacillus* المحبة للحرارة ، السكريات الخارجية، تقنيات الإنتاج.

Table des matières

Revue bibliographique

Introduction	01
---------------------------	----

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

1. Polysaccharides.....	03
1.1. Définition.....	03
1.2. Classification.....	03
2. Exopolysaccharides (EPS).....	04
2.1. Définition.....	04
2.2. Composition chimique et structure des EPS.....	05
2.3. Rôle physiologique des EPS.....	07
2.4. Classification des EPS.....	09
2.4.1. Homopolysaccharides.....	09
2.4.1.1. Levane.....	10
2.4.1.2. Dextrane.....	10
2.4.2. Hétéropolysaccharides.....	11
2.4.2.1. Xanthane.....	11
2.4.2.2. Alginate.....	11
2.5. Voies de biosynthèse des EPS.....	12
2.6. Exopolysaccharides dans le biofilm.....	14
2.6.1. Définition de biofilm.....	14
2.6.2. Rôle des exopolysaccharides dans les biofilms.....	15

2.6.3. Les Exopolysaccharides pour la prévention et la lutte contre la formation de biofilms indésirable.....	17
2.7. Méthodes d'Extraction des EPS.....	17
2.8. Applications industrielles des EPS.....	21

Chapitre II: Les bacilles thermophiles

1. La thermophilie.....	23
2. Les bactéries thermophiles.....	24
2.1. Les biotopes chauds.....	24
2.2. Définition des bactéries thermophiles.....	24
3. Besoins nutritifs des bactéries thermophiles.....	26
4. Adaptation des thermophiles aux conditions de températures élevées.....	26
4.1. Les lipides et la membrane.....	27
4.2. Les protéines et les acides aminés.....	27
4.3. Les acides nucléiques.....	27
5. Les bacilles thermophiles.....	28
5.1. Définition.....	28
5.2. Les différents groupes de bacilles thermophiles.....	29
5.2.1. Les thermophiles obligatoires.....	29
5.2.2. Les thermophiles facultatifs.....	29
5.3. Taxonomie.....	29
5.4. Les caractéristiques générales des bacilles thermophiles.....	30

Chapitre III: La production d'exopolysaccharides (EPS) par les bacilles thermophiles

1. La production des EPS par la bactérie <i>Paenibacillus tarimensis</i> REG 0201M.....	33
2. La production des EPS par la bactérie <i>Bacillus thermoantracticus</i>	34
3. La production des EPS par la bactérie thermophile <i>Geobacillus sp.</i> souche WSUCF1.....	37
4. La production des EPS par les bactéries thermophiles <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> ArzA-6 et <i>Geobacillus toebii</i> ArzA-8.....	40
5. La production des EPS par la bactérie thermophile <i>Aeribacillus pallidus</i> 418.....	41
6. La production des EPS par <i>Geobacillus sp.</i> 4004.....	44
7. La production des EPS par la bactérie <i>Brevibacillus thermoruber</i> souche 423.....	45
8. La production des EPS par la bactérie thermophile <i>Geobacillus thermodenitrificans</i> B3-72.....	48
9. La production des EPS par la souche <i>Bacillus licheniformis</i> WSF-1.....	49
10. La production des EPS par la bactérie thermophile <i>Geobacillus tepidamans</i> V264.....	50
11. La production des EPS par la bactérie thermophile <i>Geobacillus sp.</i> 4001.....	51
12. La production des EPS par la bactérie thermophile <i>Bacillus licheniformis</i> (T14).....	52
13. La production des EPS par la souche <i>Bacillus licheniformis</i> B3-15.....	53
Conclusion	55

Références bibliographiques

Liste des abréviations

BSA : Albumine sérique bovine

CCM : Chromatographie sur couche mince

CER : Résine échangeuse de cations

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

EDTA : Acide éthylène diaminé tétré-acétique

EPS : Exopolysaccharides.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

HEK-293 : Humain embryonic kidney 293 cells: Les cellules 293 de rein embryonnaire humain

HPAE-PAD : High-Performance Anion-Exchange chromatography with Pulsed Amperometric Detection: chromatographie d'échange d'anions à haute performance avec détection ampérométrique pulsée

HPLC : High performance liquide chromatography-chimatic: chromatographie en phase liquide à haute performance ou haute pression

HPSEC : High pressure size exclusion chromatography: Chromatographie d'exclusion stérique à haute pression

MO : Milieu optimisé

OPX : protéine d'exportation de la membrane externe

PCP : polysaccharide copolymérase

RMN : Résonance magnétique nucléaire

Rpm : Rounds perminute : tours par minute

SD : Milieu semi-défini

SEM ou MEB : Scaming Electron Microscopy: Microscopie électronique à balayage

TFA : Trifluoroacétique

TSB : Trypic Soy Broth: Bouillon Tryptone-Soja

Liste des figures

Figure 1: Représentation des homo et hétéropolysaccharides.....	9
Figure 2: Relation entre la température et les taux de croissance pour des micro-organismes psychrophile, mésophiles, thermophiles et hyperthermophiles typiques.....	23
Figure 3: Exemples de biotopes naturels chauds.....	24
Figure 4: Courbe de croissance et production de polysaccharides par <i>B. thermoantarcticus</i> en culture discontinue et culture en fermenteur.....	36
Figure 5: Évolution temporelle de la croissance et de la production des EPS par WSUCF1 en bioréacteur.....	39
Figure 6: Évolution temporelle de la croissance et de la production des EPS par les souches <i>G. thermodenitrificans</i> ArzA-6 et <i>G. toebii</i> ArzA-8.....	41
Figure 7: Effet de la source de carbone sur la production de biomasse et des EPS par <i>A. pallidus</i> 418 dans un milieu de base additionné de différents sucres.	43
Figure 8: Évolution temporelle de la croissance et de la production des EPS par <i>A. pallidus</i> 418 dans le milieu optimisé en fermenteur	44
Figure 9: Évolution dans le temps de la formation de la biomasse et de la production d'exopolysaccharides des cultures en bioréacteur <i>Brevibacillus thermoruber</i> souche 423.....	47
Figure 10 : Évolution dans le temps de la croissance et de la production des EPS à partir d'une souche V 264	51

Liste des tableaux

Tableau 1: Les rôles attribués aux exopolysaccharides dans le biofilms	16
Tableau 2: Méthodes physiques d'extraction d'exopolysaccharides.....	19
Tableau 3: Méthodes chimiques d'extraction d'exopolysaccharides.....	20
Tableau 4: Certains exopolysaccharides microbiens et leurs applications.....	22
Tableau 5: Températures cardinales de certains microorganismes thermophiles et hyperthermophile.....	25
Tableau 6: La production des EPS dans un fermenteur ^a et dans une culture discontinue	37

Introduction

Introduction

La demande croissante de polymères naturels pour divers secteurs industriels ces dernières années, conduit à un intérêt remarquable pour la production d'exopolysaccharides par les microorganismes. Divers microorganismes ont une capacité de produire des polysaccharides extracellulaires et les excréter en dehors de la cellule sous forme de polymères solubles ou insolubles (**Suresh Kumar et al., 2007**).

Ces polysaccharides produits de manière extracellulaire font l'objet d'une attention particulière car ils présentent une grande diversité de propriétés structurales et fonctionnelles. Un nombre important d'exopolysaccharides microbiens (EPS) ont été rapportés au cours des dernières décennies et leur structure, composition, biosynthèse et propriétés fonctionnelles ont été largement étudiées (**Sutherland, 2002 ; Guezennec, 2016**). Ils ont généralement des temps de production beaucoup plus courts (**Freitas et al., 2017**) avec un rendement constant et reproductible qui peut être maintenu tout au long de l'année (**Giavasis 2013 ; Oliveira et al., 2022**) de plus leur extraction est beaucoup plus simple (**Freitas et al., 2017**).

En raison de leurs compositions chimiques uniques et complexes et de leurs propriétés physico-chimiques et rhéologiques distinctes, les EPS microbiens peuvent avoir une large gamme d'applications dans les industries dans divers domaines tels que l'alimentation humaine et animale, l'emballage, l'industrie chimique, textile, cosmétique et pharmaceutique, agriculture et médecine. Malheureusement, seuls quelques EPS microbiens ont été utilisés avec succès dans le commerce en raison de leurs coûts de production élevés. (**Ates, 2015**).

Les microbes capables de produire des exopolysaccharides ont été isolés de différentes sources naturelles, y compris des niches extrêmes telles que les sources géothermiques, les environnements froids, les lacs salés et les marais salants. Au cours des dernières années, un nombre important de genres et d'espèces bactériens thermophiles producteurs d'EPS ont été isolés à partir de bouches hydrothermales profondes et de sources géothermiques terrestres. Les bacilles thermophiles, de fait de leur croissance rapide dans des milieux relativement simples avec des sources peu coûteuses de carbone et d'azote, présentent un grand intérêt. *Bacillus*, *Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Aeribacillus* et *Brevibacillus* sont parmi les genres productrices d'EPS les plus courants (**Panosyan et**

al., 2018). De même les EPS produits par des bactéries thermophiles ont un grand potentiel en raison de leur thermostabilité et de leurs activités biologiques, de leur non-cytotoxicité, de leurs effets antiviraux et immunostimulants (**Kambourova et al., 2009 ; Wang et al., 2017 ; Arena et al., 2009 ; Wang et al., 2021**).

Notre travail est une revue de littérature qui a pour objectifs d'effectuer une synthèse sur la production d'exopolysaccharides par des souches de *Bacillus* thermophiles et hypertemophiles parmi lesquels *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus toebii*, *Aeribacillus pallidus*, *Brevibacillus thermoruber* et signaler l'importance de ces microorganismes car les études à venir sur les mécanismes cellulaires et moléculaires autorisant la survie à haute température permettront de mieux comprendre les relations « structure -fonction » intervenant dans ces mécanismes . De plus, ces études donneront l'opportunité d'identifier de futures applications en biotechnologie.

Chapitre I :

Généralités

Sur les

Exopolysaccharides

1. Polysaccharides

1.1. Définition des polysaccharides

Les polysaccharides (polyholosides, polyosides) sont des polymères de nature glucidique (**Sanin et al., 2003**), font partie de la classe des fibres alimentaires (**Hutkins, 2006**). Les polyosides sont constitués d'un grand nombre des oses, plus de 10 monosaccharides constitués de 3 à 9 atomes de carbone, liés entre eux par l'intermédiaire des liaisons osidiques (**Lehninger, 1982**). Cette liaison osidique est formée en éliminant une molécule d'eau entre l'hydroxyle hémiacétalique en C1 d'un ose et l'un quelconque des hydroxyles de l'autre molécule osidique (**Bruneton, 1999**). Leurs propriétés rhéologiques (gélifiants, stabilisants, émulsifiants, épaississants, etc.) utilisées dans l'industrie alimentaire, l'industrie pétrolière, la cosmétique, les peintures, les adhésifs, les biomatériaux (**Délatre, 2005**).

Ils ont une bonne biocompatibilité ce qui confère à ces biomolécules de grandes possibilités d'utilisation industrielle en général, et plus spécifiquement, dans l'industrie chimique ainsi que dans l'industrie pharmaceutique et médical. Un intérêt particulier est maintenant porté aux polysaccharides multifonctionnels ayant une application incontestée dans les domaines biomédicaux. En fait, beaucoup de recherches ont été faites sur les propriétés immunomodulatrices et immunostimulantes sur des activités anti-tumorales et anti-virales, etc., avec des composés polysaccharidiques dérivés de plantes, d'animaux et d'algues ou des bactéries (**Délatre ,2005**). De plus, du fait de leurs propriétés régulatrices, les polysaccharides impliqué dans les activités cellulaires (prolifération, différenciation, adhésion et émigration). Il n'est donc pas étonnant que certains d'entre eux peuvent interagir avec des systèmes biologiques (**Délatre ,2005**).

1.2. Classification des polysaccharides

Selon le produit visé et l'effet recherché plusieurs types de polysaccharides provenant de différentes sources peuvent être utilisés. Ils peuvent être d'origine végétal (pectine, amidon, cellulose), algale (alginate, agar-agar, carraghénine) ou d'origine bactérienne ou fongique (gomme gellan, gomme xanthane, chitine) (**Duboc et Mollet, 2001**).

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

Les polysaccharides microbiens sont divisés en trois catégories selon leur localisation dans la cellule :

- ❖ Les polysaccharides intracellulaires (du cytosol).
- ❖ Les polysaccharides structuraux de la paroi cellulaire.
- ❖ Les polysaccharides extracellulaires.

Les premiers sont difficile à extraire, appelés polysaccharides de stockage, comme le glycogène situé dans le cytoplasme.

Les polysaccharides structuraux de la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives, tels que le peptidoglycane et l'acide lipotéichoïque, et lipopolysaccharides ancrés dans la membrane externe des bactéries Gram-négatives (**Ruas-Madiedo et Reyes-Gavilán, 2005**).

Les polysaccharides extracellulaires, dont certaines bactéries peuvent sécréter une couche de polysaccharides à leur surface, sont regroupés avec certaines glycoprotéines dans le cadre général du terme "glycocalyx", ce dernier groupe se présente sous deux formes de base, sous forme de capsule intimement liée à la surface de la cellule soit polysaccharides strictement extracellulaires (EPS), qui sont excrétés dans le milieu extérieur, entourant parfois les cellules de la muqueuse (**Cerning, 1990**). Certaines bactéries peuvent produire à la fois des exopolysaccharides libres et capsulaires alors que d'autres n'en produisent qu'un seul type (**Hassan, 2008**).

2. Les exopolysaccharides

2.1. Définition

Les exopolysaccharides (EPS) : sont des biopolymères naturels, non toxiques, biodégradables, à longues chaînes, de poids moléculaire élevé, composés d'unités monosaccharidiques liées ensemble par une liaison glycosidique (**Roca et al., 2015 ; More et al., 2021**). Ils comprennent principalement le glucose, le galactose et le rhamnose, et peuvent inclure des constituants non glucidiques tels que l'acétate, le puryvate, le succinate et le phosphate (**Paulo et al., 2012**).

Le terme d'exopolysaccharide a été utilisé pour la première fois par **Sutherland** en (1792) pour décrire les polymères glucidiques présents dans le milieu extérieur des cellules microbiennes (**Nicolaus et al., 2012**). Puis repris par **Cerning** (1944) comme appellation générale pour ce groupe (**Bergmair, 2002**).

Le premier exopolysaccharide microbien le dextrane a été découvert par Louis Pasteur (1861) au milieu du XIXe siècle en tant que produit microbien dans l'industrie du vin et la bactérie *Leuconostoc mesenteriodes* a été identifiée par Van Tieghen (1878) comme souche productrice de dextrane (**Linker et Jones, 1966 ; Rehm, 2010 ; Ates, 2015 ; Sajna et al., 2021**). Au fil du temps, d'autres exopolysaccharides découverts comprennent la cellulose, l'alginate, et le xanthane (**Nwodo et al., 2012**).

Divers micro-organismes (bactéries Gram-positives et Gram-négatives, champignons et aussi certaines algues) possèdent la capacité de synthétiser et d'excréter des exopolysaccharides dans l'environnement extracellulaire sous forme de polymères solubles et insolubles (**Panosyan et al., 2018 ; Kirmizibekmez et al., 2019**). Par conséquent, la composition et les fonctions des polysaccharides extracellulaires, les propriétés chimiques et physiques qui en établissent la conformation primaire varient d'une espèce bactérienne à l'autre (**Ates, 2015 ; Kirmizibekmez et al., 2019**).

Il a été mis en évidence que les bactéries ont une meilleure capacité d'excretion des exopolysaccharides par rapport aux champignons et aux algues (**Abinaya et al., 2018**). En particulier les *Bacillus* sont de grandes espèces productrices des exopolysaccharides, qui sont maintenant reconnus comme des probiotiques (**Abinaya et al., 2018**). Parmi ces bactéries Gram positives : *Bacillus polymixa*, *Bacillus sphaericus* et *Bacillus licheniformis* sont largement étudiées (**Angel et al., 2018**).

2.2. Composition chimique et structure des EPS

Contrairement aux exopolysaccharides végétaux, les connaissances collectées sur les propriétés structurales des polysaccharides extracellulaires microbiens et notamment les polysaccharides des bactéries thermophiles sont rares (**Kambourova et al., 2016**).

Le groupe des exopolysaccharides microbiens et surtout bactériens se caractérise par une grande diversité structurale. Cette diversité de forme et de structure dépend de plusieurs aspects qui comprennent le type de sucre, et de dérivés de sucres, les composants

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

supplémentaires comme les résidus pyruviques, acétyles ou glycérols, les types de liaisons trouvées dans le polymère, la variation des arrangements des monomères ainsi que la ramification de polymère par des chaînes latérales supplémentaires (**Schmid, 2019**).

Les unités les plus courantes qui constituent les exopolysaccharides microbiens sont les monosaccharides tels que les hexoses (comme D-glucose, D-mannose, L-rhamnose, D-galactose, L-fucose, D-allose) , les pentoses (D-ribose, D-arabinose, D-xylose) des sucres aminés (D-galactosamine, D-glucosamine) et certaines acides uroniques tels que l'acide D-galacturonique et l'acide D-glucuronique (**Poli et al., 2010 ; Finore et al., 2014**). En plus des sucres, les exopolysaccharides peuvent contenir de nombreux substituants à liaison ester comme les cétales d'acétate, l'acide pyruvique et l'acide succinique (**Molina et Ruiz-Ruiz, 2012**). D'autres substituants inorganiques tels que le sulfate et le phosphate peuvent également être trouvés (**Nichols et al., 2005 ; Brian Jaisson, 2014**). Le phosphate est beaucoup plus abondant et il apparaît notamment dans l'exopolysaccharide des bactéries à Gram négatives. Le sulfate se trouve le plus souvent dans les exopolysaccharides des bactéries halophiles et les archées et dans les polysaccharides eucaryotes (**Molina et Ruiz-Ruiz, 2012**).

La majorité des exopolysaccharides ont une structure linéaire avec un poids moléculaire moyen compris entre 1×10^5 et 3×10^5 Da (**Poli et al., 2010**). Certains polysaccharides sont des polymères neutres mais beaucoup d'entre eux sont polyanioniques en raison de la présence d'acide uronique ou de l'acide pyruvique liés au cétales ou de résidus inorganiques (**Poli et al., 2010 ; Finore et al., 2014**).

De nombreuses liaisons peuvent se produire en même temps dans un exopolysaccharide, les liaisons β -1,4 ou β -1,3 entre les sucres se trouvent surtout dans le squelette rigide de l'exopolysaccharide comme dans le squelette cellulosique du xanthane de *Xanthomonas campestris* (**Nicolaus et al., 2010 ; Kambourova et al., 2019**). Par contre la présence des liaisons de type α -1,2 ou α -1,6 fournit plus de flexibilité aux polymères telles que les liaisons rencontrées dans plusieurs dextrans (**Sutherland, 2001b ; Nicolaus et al., 2010 ; Poli et al., 2010 ; Brian Jaisson, 2014**).

La composition chimique, la structure et la masse moléculaire déterminent la configuration finale des exopolysaccharides, ils peuvent former des brins fins (structure primaire) des doubles ou triples hélices (structure secondaire) ou un réseau plus complexe (structure tertiaire) (**Sutherland 1994 ; Molina et Ruiz-Ruiz, 2012 ; Kambourova et al., 2016**).

Les monosaccharides principales de la majorité des exopolysaccharides excrétés par les bactéries thermophiles sont le glucose et le mannose, mais le galactose et le fructose ont été également rapportés (**Kambourova et al., 2016**). L'exopolysaccharide de la bactérie thermophile *Bacillus licheniformis* WSF-1 est composé de glucose et de mannose comme principaux monosaccharides (**Angel et al., 2018**). La souche thermophile *Bacillus* (T-14) isolée d'une source hydrothermale peu profond de l'île de Panaria (Italie) a produit un nouvel exopolysaccharide avec le fructose et le fucose comme composants Majeurs (**Spanò et al., 2013**).

De plus les exopolysaccharides de *Bacillus* thermophiles sont caractérisés par leur poids moléculaires élevés (**Kambourova et al., 2016**). Des poids moléculaires de 380, 400, 1000 KDa ont été signalés pour ces polymères (**Nicolaus et al. 2003 ; Kambourova et al., 2016**). L'exopolysaccharide de la souche de *Bacillus* (T-14) présentait un poids moléculaire élevé (environ 1000 kDa) (**Spanò et al., 2013**). L'exopolysaccharide d'une autre bactérie thermophile *Geobacillus tepidamans* V264 avait un poids moléculaire supérieur à 1000 KDa (**Kambourova et al., 2009 ; Kambourova et al., 2016**). De même la bactérie *Bacillus licheniformis* B3-15 thermotolérante a été signalée comme productrice d'un nouvel exopolysaccharide (EPS B3-15) avec un poids moléculaire élevé (600 KDa) (**Caccamo et al., 2020**). Pour *Geobacillus thermoantrartarticus*, Le poids moléculaire a été déterminé comme étant d'environ 300 KDa (**Manca et al., 1996 ; Kambourova et al., 2016**).

La thermostabilité est la caractéristique clé des exopolysaccharides des bactéries thermophiles (**Angel et al., 2018**). La stabilité thermique la plus élevée étant signalé pour les exopolysaccharides de *Geobacillus tepidamans* V264 (280 °C) (**Kambourova et al., 2009**), *Geobacillus thermodenitrificans* souche B-3-72 (240 °C) (**Arena et al. 2006**) et *Bacillus licheniformis* (240°C) (**Spanò et al., 2013 ; Kambourova et al., 2016**).

2.3. Rôle physiologique des EPS

La production des exopolysaccharides peut demander un coût énergétique notable pouvant aller jusqu'à 70 %, Ce qui représente un investissement important en énergie et en carbone pour la cellule bactérienne (**Nichols et al., 2005**). Cependant les avantages dérivés de la production de polymères extracellulaires améliorent la croissance et la survie des micro-organismes des communautés complexes dans lesquels ils existent (**Nichols et al., 2005**).

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides peuvent remplir de nombreuses fonctions physiologiques qui peuvent varier d'un micro-organisme à l'autre selon les cellules productrices ainsi que leurs niches écologiques (**Patel et Prajapat 2013 ; Abid et Azabou, 2022**). Les polysaccharides extracellulaires protègent les micro-organismes en tant que barrière physique (**Kambourova et al., 2016**). Leur production est une réponse directe aux pressions environnementales telles que le pH, la température, le stress osmotique, l'intensité lumineuse et la pression atmosphérique (**Otero et Vincenzini 2003 ; Kambourova et al., 2016**). En cas d'espèces thermophiles les exopolysaccharides aident à l'adaptation aux conditions défavorables (**Kambourova et al., 2016**). Par conséquent la production des exopolysaccharides est essentielle à la survie de tels micro-organismes (**Rana et Upadhyay, 2020**).

L'entourage de la cellule microbienne par une couche de polysaccharide extracellulaire à haute teneur en eau, peut lui fournir une protection contre la dessiccation lui permettant de survivre dans des environnements pauvre en eau (**Donot et al., 2012 ; Kambourova et al., 2016**).

De plus, les EPS sont essentiels dans le mécanisme d'adhésion aux surfaces et aux autres organismes (**Characklis et al., 1989**), dans la formation des agrégats (**Poli et al., 2010**) et dans l'absorption des nutriments indispensables au maintien et à la prolifération des bactéries (**Sutherland, 1972 ; Costerton et Irwin, 1981 ; Geesey, 1982**).

Les exopolysaccharides participent également à la dégradation de certains métaux en raison de leur caractère anionique et de leur capacité à fixer les métaux et les ions (**Donot et al., 2012**). Une autre fonction d'EPS est de protéger les cellules contre la phagocytose (**Chan et al., 2004**).

Les exopolysaccharides présentent un comportement de type colle (**Arora et al., 2015 ; Rana et Upadhyay, 2020**). Par conséquent ces polysaccharides sont souvent impliqués dans la formation et surtout la consolidation de biofilm (**Ma et al., 2006 ; Dimopoulou, 2013**) dans lequel ils peuvent représenter 50 à 90 % de la matière organique totale (**Donlan, 2002 ; Dimopoulou, 2013**). Ce biofilm assure une protection contre les forces mécaniques, les composés antimicrobiens, les antibiotiques et la prédation par les protozoaires (**Badel et al., 2011 ; Donot et al., 2012 ; Caggianiello et al., 2016**). De plus ces exopolymères facilitent les communications entre les cellules parce qu'ils collectent les bactéries et diminuent les distances intercellulaires (**Badel et al., 2011**).

En général, les exopolysaccharides ne semblent pas fonctionner comme des réserves d'énergie (**Donot et al., 2012**) et les micro-organismes producteurs ne sont pas capables de cataboliser les exopolysaccharides qu'ils ont produits (**Cerning et al., 1994**). Cependant en cas de faible source organique dans les environnements extrêmes, les exopolysaccharides de bactéries hyperthermophiles jouent le rôle de polymères de stockage extracellulaire (**Kirmizibekmez et al., 2019**).

2.4. Classification des EPS

La composition en monosaccharides est un paramètre clé pour diviser les exopolysaccharides en deux types principaux à savoir des homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides (**Abid et Azabou, 2022**) (**Figure 1**).

Au-delà de leurs compositions chimiques les deux types de polysaccharides se diffèrent également par leur niveau de production et leurs voies de biosynthèse (le nombre des enzymes et l'organisation des gènes impliqués dans leur synthèse) (**Hidalgo-Cantabrana et al., 2012 ; Dimopoulou, 2013**).

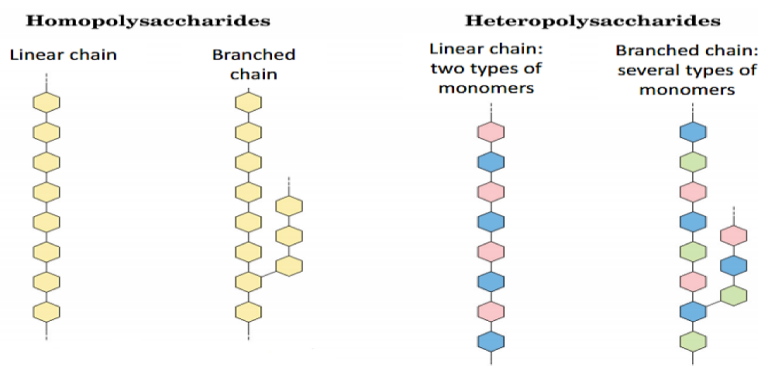


Figure 1: Représentation des homo et hétéropolysaccharides (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**).

2.4.1. Les homopolysaccharides

Les homopolysaccharides sont composés d'un seul type de monosaccharide répété plusieurs fois tels que le pullulane, le curdlan, la cellulose le dextrane, etc (**Brian Jaisson, 2014 ; Rana et Upadhyay, 2020**). Ces homopolymères sont classés en fonction des liaisons et de résidus saccharidiques en différents groupes comme les D-glycanes, les

β -D-glucanes, les fructanes et les polygalactanes (Mohite et al., 2017 ; Rana et Upadhyay, 2020). Les masses moléculaires des homopolysaccharides sont généralement comprises entre 4×10^4 et 6×10^6 Da et leurs rendements peuvent aller jusqu'à plusieurs grammes par litre contrairement à ceux des hétéropolysaccharides compris entre 50 et 200 mg/L (Badel et al., 2011).

2.4.1.1. Levane

Le levane est un exopolysaccharide microbien constitué d'unités de fructoses interconnectés par des liaisons glycosidiques de type β -2,6 avec des ramifications en position β -2,1 (Akan et Oner, 2022). Il est produit à partir de saccharose par l'action de l'enzyme levansucrase, qui convertit directement le saccharose en polymère (Ates, 2015), par une variété de micro-organismes tels que *Acetobacter*, *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Zymomonas* (Erkorkmaz et al., 2018). Mais non seulement synthétisé par des bactéries mais également par certains archées halophiles, levures et certains champignons (Akan et Oner, 2022). Ce homopolysaccharide possède de nombreuses propriétés distinctes telles qu'une bonne biocompatibilité, une solubilité élevée, une forte adhésivité, une faible viscosité et une capacité filmogène (Ates, 2015 ; Öner et al. 2016; Versluys et al. 2018 ; Akan et Oner, 2022).

2.4.1.2. Dextrane

Le dextrane est un homopolysaccharide hautement ramifié, neutre et de haut poids moléculaire (More et al., 2021), composé de nombreuses molécules de glucose liées entre eux par des liaisons α -1,6 (Kanika et Hema, 2016) avec un degré variable de ramifications latérales via des liaisons α -1,2, α -1,3 ou des liaisons α -1,4 (Dhaneshwar et al., 2022). Il s'agit d'un type d' α -glucane synthétisé à partir de saccharose à l'aide de l'enzyme extracellulaire bactérienne dextransucrase, qui est généralement sécrétée par divers genres bactériens mésophiles et thermophiles notamment *Leuconostoc*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Banerjee et Bandopadhyay, 2016). Le dextrane est disponible dans une large gamme de poids moléculaire entre 10 et 50000 kDa (Kothari et al., 2014 ; Umut, 2022).

2.4.2. Les hétéropolysaccharides

Contrairement aux homopolysaccharides, les hétéropolysaccharides sont constitués d'unités répétitives de différents sucres dont le nombre varie entre tri et Octasaccharides (**Hongpattarakere et al., 2012**). Les résidus saccharidiques les plus fréquemment trouvés dans ces polymères sont le glucose le rhamnose et le galactose mais dans des proportions différentes (**Abid et Azabou, 2022**). En général ils ont des poids moléculaires élevés de l'ordre de 5×10^5 à 2×10^6 Da (**Bergmaier, 2002**). Leur composition est beaucoup plus diversifiée que celle des homopolysaccharides, elle comprend des sucres neutres, acides ou encore des amines (**Sanlibaba et Çakmak, 2016**). De nombreuses bactéries peuvent synthétiser les hétéropolysaccharides comme l'espèce *Xanthomonas campestris* qui produit le xanthane (**Brian Jaisson, 2014**).

2.4.2.1. Xanthane

Le xanthane est un biopolymère exocellulaire dont la structure primaire est constituée d'unités répétitives de pentasaccharides (**Ates, 2015**) formée de deux unités de glucose, deux unités de mannose et une unité d'acide glucuronique (**Kanika et Hema, 2016**) avec de nombreuses chaînes latérales de trisaccharide (**Umut, 2022**) qui comportent une unité d'acide glucuronique entre deux unités de mannose (**Kanika et Hema, 2016**). En raison de ses extraordinaires propriétés telles que la viscosité élevée et la stabilité aux changements de température et aux pH acides et alcalins (**Kanika et Hema, 2016**). Le xanthane a trouvé une large gamme d'applications en tant qu'agent épaississant ou stabilisant dans les industries alimentaires et cosmétiques (**Ates, 2015**).

2.4.2.2. Alginate

Également appelé acide alginique (**Umut, 2022**) ou algine (**Kanlayavattanakul et Lourith, 2022**). C'est un polysaccharide anionique, linéaire avec un poids moléculaire de $1,0 - 1,4 \times 10^3$ (**Kanlayavattanakul et Lourith, 2022 ; Umut, 2022**) constitué d'acide mannuronique et guluronique formant des blocs de séquences d'acides polymannuroniques et de séquences d'acides polyguluroniques et de séquences mixtes (**Rehm, 2009 ; Freitas et al., 2011**).

Ils sont généralement extraits des algues brunes mais peuvent également être synthétisés par voie microbienne par les bactéries *Azotobacter vinelandii* et *Pseudomonas aeruginosa* sous forme de biofilm (Umut, 2022 ; Akan et Oner, 2022). Les alginates des algues et de bactéries se différencient par le fait que ces derniers sont acétylés (Rehm, 2009 ; Freitas et al., 2011). Ces polymères sont utilisés dans de nombreuses applications : les matériaux d'encapsulation dans les produits pharmaceutiques, les agents adhésifs, les stabilisants, les épaississants etc (Akan et Oner, 2022).

2.5. Les voies de biosynthèse des EPS

La biosynthèse des exopolysaccharides est un processus complexe (Sanlibaba et Çakmak, 2016) qui comprend un grand nombre des gènes codant à la fois pour les facteurs de régulation et des enzymes impliquées dans la biosynthèse, la polymérisation et l'exportation des exopolysaccharides (Madhuri et Prabhakar, 2014). La synthèse des homopolysaccharides s'effectue grâce à des enzymes extracellulaires spécifiques (Roger, 2002 ; Donot et al., 2012) excrétées à l'extérieur de la cellule ou localisées au niveau de la paroi cellulaire (Madhuri et Prabhakar, 2014). Concernant les hétéropolysaccharides les voies de biosynthèse sont plus complexes (Jolly et al., 2002). Ils sont synthétisés de manière intracellulaire (Freitas et al., 2011) à l'aide de précurseurs activés et de molécules porteuses (Nichols et al., 2005) et exportés vers le milieu extérieur sous forme de macromolécules (Freitas et al., 2011 ; Madhuri et Prabhakar, 2014).

Les mécanismes généraux de biosynthèse des exopolysaccharides comprennent la voie Wzy-dépendante, la voie ABC transporteur dépendante, la voie synthase-dépendante et la voie de synthèse extracellulaire (Nanjani et Soni, 2012 ; Rana et Upadhyay, 2020). Cependant au sein d'une même espèce bactérienne il existe la possibilité de coexistence de deux ou plusieurs mécanismes de biosynthèse aboutissant à la production de polysaccharides microbiens différents (Fernandes et al., 2021).

La voie Wzy-dépendante : est sans aucun doute la voie la plus courante pour la synthèse des exopolysaccharides structurellement complexes (Knirel et Kenyon, 2022). Elle débute par la production de précurseurs activés, qui sont des sucres riches en énergie, principalement des sucres nucléotidiques diphosphates, qui sont des dérivés de sucres phosphorylés (Freitas et al., 2011). La construction des unités répétitives se produit au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique (Nichols et al., 2005 ; Madhuri et

Prabhakar, 2014) et dépend de l'ajout séquentiel des sucres activés sur un lipide, l'undécapényl phosphate (und-p) dont la tête phosphate chargée est orientée vers le cytoplasme et la queue hydrophobe est insérée dans la membrane cytoplasmique (**Cartee et al., 2005**). Cet assemblage est catalysé par des glycosyltransférases spécifiques à partir d'oses nucléotidylés (**Whitfield et paiment, 2003**). Puis une protéine Wzx (protéine flippase) transfère les unités répétées liées au lipide de la surface interne de la membrane vers la surface extracellulaire où elles sont polymérisées par la protéine Wzy (**Islam et Lam 2013 ; Caggianiello et al., 2016**) pour former une longue chaîne (**Cruz-Aldaco et al., 2022**). Enfin l'EPS est libéré dans l'environnement extracellulaire (**Cruz-Aldaco et al., 2022**) par la polysaccharide copolymérase (PCP) et la protéine d'exportation de la membrane externe (OPX) (**Islam et Lam, 2014 ; Wang et al., 2019b**).

La voie Wzy-dépendante produit des hétéropolymères qui ont des modèles de sucres divers dans leur structure chimique. En outre, toutes les bactéries qui utilisent ce mécanisme possèdent les gènes de la protéine flippase (Wzx) et de polymérase (Wzy) au niveau de leurs opérons (**Poli et al., 2019**).

La deuxième voie de biosynthèse des exopolysaccharides est la voie ABC transporteur dépendante, qui est principalement utilisée pour la production du polysaccharide capsulaire (**Nwodo et al., 2012 ; Rana, Upadhyay, 2020**). En particulier, les homopolysaccharides et certains hétéropolysaccharides dont les unités répétitives sont relativement petites (jusqu'à 3 résidus de sucre) sont synthétisées par ce mécanisme (**Knirel et Kenyon, 2022**).

Dans cette voie, la chaîne EPS est assemblée sur un support lipidique situé sur la surface interne de la membrane (**Poli et al., 2019**) par l'action de glycosyltransférases (**Kamat, 2021**). Il est ensuite exporté à travers la membrane interne par un transporteur ABC au lieu des protéines Wzx et Wzy alors que la libération est toujours médiée par les protéines PCP et OPX (**Whitney et Howell, 2013 ; Wang et al., 2021**). Le transporteur ABC est constitué de deux domaines transmembranaires wzm (codés par les genes wzm) et deux domaines de liaison aux nucléotides wzt (codés par les genes wzt) (**Hug et Feldman 2011 ; Greenfield et Whitfield 2012; Knirel et Kenyon, 2022**).

La voie suivante impliquée pour la biosynthèse d'exopolysaccharides dans les cellules microbienne est la voie synthase-dépendante (**Rana et Upadhyay, 2020**). Dans ce système, la chaîne EPS est polymérisée puis transloquée à travers la membrane interne

par une seule protéine synthase (**Poli et al., 2019**) qui est une unité d'un complexe multiprotéique transmembranaire (**Kamat, 2021**).

Les exopolysaccharides produits via cette voie sont relativement simples et sont constitués d'un seul ou de deux monosaccharides regroupés en une chaîne linéaire non ramifiée (**Cartee et al., 2001 ; Hubard et al., 2012**). Selon la nature de polysaccharide, la synthèse peut se produire en présence ou en absence d'une molécule acceptrice lipidique et ne nécessite pas la protéine flippase impliquée dans la translocation des unités répétitives (**Ates, 2015**).

La dernière est la voie extracellulaire ou la voie médiée par la sucrase (**Kumar et al., 2011 ; Rana et Upadhyay, 2020**). Dans ce procédé les molécules du disaccharide sont d'abord converties en monosaccharides puis transférées directement vers des chaînes de polysaccharide en croissance dans le milieu extracellulaire (**Kumar et al., 2011 ; Rana et Upadhyay, 2020**) par l'activité d'une seule protéine sucrase (**Poli et al., 2019**) qui révèle de la catégorie des glycosylhydrolases (**Fernandes et al., 2021**).

Le clivage des liaisons osidiques de sucre conduit à la libération d'énergie qui est utilisée pour catalyser le transfert du résidu glycosyle vers la chaîne polysaccharidique en croissance (**Kumar et al., 2011 ; Rana et Upadhyay, 2020**). Ce type de synthèse de polysaccharides microbiens est simple et indépendant du métabolisme central du carbone avec des modifications structurales limitées (**Kumar et al., 2011 ; Ates, 2015 ; Rana et Upadhyay, 2020**).

2.6. Exopolysaccharides dans le biofilm

Les biofilms ont été assimilés à la "ville des micro-organismes", et les biopolymères extracellulaires (dont prédominent les exopolysaccharides) sont appelés "la maison des cellules du biofilm" (**Schembri, 2004**).

2.6.1. Définition de biofilm

Il est difficile de donner une définition qui puisse être considérée comme correcte et complète qu'est-ce que le biofilm (**Medeiros, 2016**). En effet, ils sont une communauté de microorganismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) (**Sutherland, 2001b**) qui peuvent coloniser les surfaces environnantes et s'organiser en un film de

plusieurs centaines de microns d'épaisseur. Ils sécrètent une matrice extracellulaire polymère assurer une véritable cohésion et la protection physique de la colonie, avec un effet possible à la fois bénéfique et mortel à cause de son environnement (**Douarche et al., 2018**). Bien que le composant principal des biofilms soit l'eau (97 %)(**Zhang et al., 1998; Sutherland, 2001b**), le reste est constitué d'une combinaison complexe de cellules bactériennes et de produits extracellulaires sécrétés (lectines, lipides, protéines), qui sont principalement composés d'un grand nombre d'éléments polysaccharides homogènes et hétérogènes (**Whiteley et Lee, 2015**). Ils sont le résultat de processus cycliques systématiques complexes. Ceux-ci comprennent le transport et l'adsorption de particules organiques et inorganiques, les microorganismes sur les surfaces humides et ensuite la production d'exopolysaccharides, biopolymères qui sont impliqués dans le processus de fixation du biofilm (**Das et al., 2013**).

La majorité des exopolysaccharides retrouvés dans les biofilms sont l'acide β -glucuronique, l'acide β -galacturonique et l'acide β -mannuronique, qui sont associés entre eux sous la forme d'une rigidité importante (xanthane) par des liaisons β -1,4 et/ou β -1,3. Parfois, ces liaisons peuvent être flexibles comme avec les liaisons α -1,2 et/ou α -1,6 (dextranes) (**Mayer et al., 1999 ; Sutherland, 2001b ; Whiteley et Lee, 2015**) .

2.6.2. Rôle des Exopolysaccharides dans les biofilms

Dans la nature, les bactéries existent en colonies et s'agrègent aux interfaces pour former des agrégats multibactériens tels que des tapis, des flocs, des boues ou des biofilms, et non des cellules uniques dispersées planctoniques comme on le verra dans des cultures pures de laboratoire (**Flemming et Wingender, 2010**). Les bactéries ne sont pas seules dans cet effort, car d'autres microbes sont inclus. Cependant, nous nous concentrons sur les bactéries et comment leurs exopolysaccharides jouent un rôle clé (**Nwodo et Okoh, 2012**). Les biofilms ont été largement étudiés et le **tableau 1** résume le rôle des exopolysaccharides dans les biofilms bactériens:

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

Tableau 1. Les rôles attribués aux exopolysaccharides dans les biofilms (Nwodo et Okoh, 2012).

Processus	Pertinence fonctionnelle des exopolysaccharides pour les biofilms
Adhésion	Les exopolysaccharides assurent les premières étapes de la colonisation des surfaces (biotiques et abiotiques) et la fixation à long terme des biofilms.
Cellule bactérienne agrégation	Le pontage entre les cellules est activé par les exopolysaccharides, immobilisant ainsi temporairement la population bactérienne, entraînant ainsi le développement ultérieur de densités cellulaires élevées et la reconnaissance cellule-cellule.
Rétention d'eau	Les exopolysaccharides hydrophiles ont une capacité de rétention d'eau élevée, maintenant ainsi un microenvironnement hydraté autour du biofilm, ce qui conduit à la survie de la dessiccation dans des environnements pauvres en eau.
Cohésion de biofilms	Les exopolysaccharides neutres et chargés forment un réseau de polymères hydratés (la matrice du biofilm), assurant la stabilité mécanique des biofilms (souvent en conjonction avec des cations multivalents), déterminant l'architecture du biofilm et permettant la communication cellule-cellule.
Source de nutriments	Les exopolysaccharides servent de source de composés contenant du carbone, de l'azote et du phosphore pour une utilisation par la communauté des biofilms.
Barrière de protection	Les exopolysaccharides confèrent une résistance aux défenses non spécifiques et spécifiques de l'hôte lors de l'infection, confèrent une tolérance à divers agents antimicrobiens, protègent la nitrogénase cyanobactérienne des effets néfastes de l'oxygène et offrent une protection contre certains protozoaires phagocytaires.
Liaison enzymes	L'interaction des enzymes extracellulaires non glycolytiques avec les exopolysaccharides conduit à la stabilisation de la rétention et à l'accumulation.
Évier pour l'excès d'énergie	Les exopolysaccharides stockent l'excès de carbone dans des rapports carbone/azote déséquilibrés.

Les polysaccharides extracellulaires ont été quantifiés dans des micro-biofilms présentant une variété de matrices extracellulaires à l'aide du "réactif d'acide cyclique-Schiff" d'abord titré sur des solutions de dextrane et d'alginate. Ensuite elle a été réalisée sur des biofilms de trois souches connues pour produire différents xénobiotiques (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis* et *Weisseria*) pendant 24 et 48 heures. Ce test permet de quantifier les exopolysaccharides totaux en tenant compte des interférences potentielles des cellules ou d'autres polymères extracellulaires majeurs (ADN, protéines). La quantification des polysaccharides extracellulaires dans des biofilms présentant diverses matrices extracellulaires à l'aide de "réactifs" (**Randrianjatovo-Gbalou et al., 2016**).

2.6.3. Les exopolysaccharides pour la prévention et la lutte contre la formation de biofilms indésirables

La présente invention concerne le domaine des biofilms contre les micro-organismes nuisibles. Plus précisément, la présente invention propose un procédé de traitement de surface dont le but est de protéger la surface de l'adhésion intempestive de biofilms indésirable par ajout d'exopolysaccharides. La surface à traiter est occasionnellement ou périodiquement mise en contact avec un exopolysaccharide, de préférence en solution, qui est capable de former un film protecteur d'exopolysaccharide sur la surface (**Guezennec, 2012**).

Les exopolysaccharides (EPS) de la présente invention sont obtenus par fermentation de bactéries issues d'écosystèmes hydrothermaux profonds. Plus spécifiquement, les EPS de l'invention sont ceux synthétisés dans des conditions contrôlées lors de la fermentation bactérienne (déséquilibre nutritionnel dû à des rapports carbone/azote élevés résultant de milieux nutritifs riches en carbohydrates) (**Guezennec, 2012**).

2.7. Méthodes d'extraction des EPS

Les EPS microbiens ont généralement un temps de production assez court et leur extraction est très simple (**Yildiz et Karatas, 2018**). De nombreuses méthodes ont été développées et appliquées pour extraire l'EPS des cultures microbiennes et des boues. Utiliser des méthodes chimiques, physiques et une combinaison de méthodes physiques et chimiques (**Sheng et al., 2010**). Ces différentes méthodes peuvent être comparées

selon deux critères : la quantité et la qualité de l'EPS extrait. En effet, du fait du procédé d'extraction, le produit d'extraction peut être contaminé par des réactifs chimiques d'extraction ou des protéines (**Comte et al., 2006**). Lors de l'extraction de l'EPS, la lyse cellulaire peut se produire à des niveaux variables difficiles à évaluer, que ce soit en mesurant la teneur en protéines ou en acides nucléiques de l'EPS, ou la libération de composés intracellulaires (**Sheng et al., 2005 ; D'Abzac et al., 2010 ; García Becerra et al., 2010**). Des changements dans la composition et les propriétés de l'EPS peuvent également se produire avec la destruction des macromolécules (**Wang et al., 2010**).

Différents auteurs ont comparé différentes méthodes chimiques (résine échangeuse de cations (CER), formaldéhyde/NaOH, EDTA, glutaraldéhyde ou alcaline) (**Domínguez et al., 2010b**) ont montré que l'EPS extrait avec de la résine (158 ± 3 mg/g d'EPS total) était presque identique à celui obtenu avec du formaldéhyde/NaOH (150 ± 3 mg/g d'EPS total), alors que d'autres auteurs ont comparé l'extraction alcaline à l'extraction CER (**García Becerra et al., 2010**). Ils ont obtenu 3 fois plus de matière organique (protéines, glucides, etc.) par la méthode CER que par l'extraction alcaline. La méthode CER est largement préférée en raison de la facilité d'élimination de la résine (**Sheng et al., 2005, 2010**) et de l'évitement de la contamination chimique de l'EPS (**Bérard et al., 2020**). Les méthodes basées sur l'échange de cations se sont avérées hautement sélectives pour les EPS liés aux molécules de magnésium et de calcium. L'extraction alcaline produit jusqu'à 75 % de matières organiques. Cependant, un traitement alcalin peut conduire à une destruction sévère des composants polymères et à de graves dommages cellulaires. L'EDTA provoque une légère lyse cellulaire, bien que le pouvoir d'extraction soit très efficace et que l'extraction de l'EPS puisse provoquer une contamination. Dans le cas de la méthode formaldéhyde/NaOH, le dosage du formaldéhyde modifie les propriétés du EPS et provoque une interférence significative dans la détermination des glucides constitutifs (**Sheng et al., 2005, 2010**).

Les méthodes physiques d'extraction (ultrasons, centrifugation, Micro-ondes ou chauffage) peuvent séparer l'EPS des cellules. Généralement, le traitement physique est moins efficace que les méthodes d'extraction chimiques (**Comte et al., 2006**).

Un certain nombre d'auteurs (**Compte et al., 2007; Domínguez et al., 2010a**) ont montré que, contrairement aux méthodes chimiques, le traitement physique n'affecte que la distribution du poids moléculaire des EPS, mais pas les empreintes de la chromatographie d'exclusion de taille à haute performance (HPSEC). Cependant, d'autres auteurs ont mis

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

en évidence certaines différences dans les chromatogrammes HPSEC lorsque l'EPS était extrait de différents types de boues.

De nombreuses études ont été menées pour optimiser l'extraction des EPS couplant les traitements ultrasonores avec d'autres paramètres chimiques et physiques (température, temps, pH, éthanol, ozone, etc.) (Erden *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Meng *et al.*, 2010 ; Yuan *et al.*, 2010 ; Zhong et Wang, 2010; Deng *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2011). En fait, le processus d'extraction n'utilise pas une méthode unique, mais une combinaison de techniques. Par exemple: la méthode d'extraction CER, qui était 1,1 à 1,5 fois plus efficace que l'utilisation de formaldéhyde + NaOH + sonication. (Domínguez *et al.*, 2010a).

Il n'y a pas de moyen facile d'extraire qualitativement et quantitativement tous les EPS microbiens. Les techniques d'extraction doivent être sélectionnées et optimisées pour chaque cas, en tenant compte des caractéristiques de l'EPS à extraire. Plusieurs méthodes d'extraction doivent être comparées et la méthode doit être choisie en fonction de l'objectif ultime, soit qualitativement, soit quantitativement. Afin de récupérer toutes les fractions d'EPS contenues dans les micro-organismes, des extractions combinées et répétées doivent être effectuées (Donot *et al.*, 2012) (Tableaux 2,3) .

Tableau 2. Méthodes physiques d'extraction d'exopolysaccharides

Méthodes	Applications	Références
Sonication/ Centrifugation	L'EPS se dissout en solution sous la pression impulsive créée par la sonication et la force centrifuge.	Fang et Jia (1996)
Chauffage	Le mouvement moléculaire est renforcé, ce qui accélère la dissolution de l'EPS.	Li et Yang (2007)
Centrifugation à grande vitesse	L'EPS se détache de la surface cellulaire et se dissout en solution sous la force centrifuge.	Jorand <i>et al.</i> (1996)
Sonication	La partie EPS de la matrice sous la pression impulsive créée par la sonication.	Quarmby et Forster(1995) Dignac <i>et al.</i> (1998)

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

Tableau 3: Méthodes chimiques d'extraction d'exopolysaccharides.

Méthodes	Applications	Références
Traitement alcalin	Le traitement alcalin par addition de NaOH provoque l'ionisation des groupements, tels que les groupements carboxyliques, entraînant une forte répulsion entre l'EPS et les cellules, et fait ainsi dissoudre l'EPS dans l'eau.	Sheng et al. (2005) Brown et Lester (1980)
EDTA	Les cations divalents sont très importants pour la réticulation des composés chargés dans la matrice EPS, et donc l'élimination de ces cations à l'aide d'EDTA provoque l'effondrement de la matrice EPS.	Fang et Jia (1996) Sheng et al. (2005) Bhaskar et Bhosle (2006)
CER	Le CER élimine les cations divalents, provoquant ainsi l'effondrement de l'EPS.	Jan et Nielsen (19951) Frolund et al. (1996)
Glutaraldéhyde	Comme le glutaraldéhyde a la capacité de fixer les cellules et de dénaturer l'EPS, il peut également être utilisé pour extraire l'EPS.	Azeredo et al. (1998)
NH ₄ OH/EDTA	Cette méthode combine les méthodes d'ajustement du pH et d'échange d'ions pour améliorer l'efficacité de l'extraction. L'utilisation d'un alcali fort tel que NH ₄ OH réduit la lyse cellulaire	Sato et Ose (1984)
HCHO/NaOH	L'ajout de HCHO réduit la lyse cellulaire causée par l'ajout de NaOH.	Liu et Fang (2002)
Extraction d'éthanol	Dénature l'EPS et réduit la force de liaison entre l'EPS et les cellules.	Forster et Clarke (1983)
Traitement acide	Améliore la force répulsive et perturbe l'interaction entre l'EPS et les cellules, provoquant la chute de l'EPS de la surface cellulaire.	Sheng et al. (2005)
Extraction enzymatique	Les enzymes d'hydrolyse des glucides et des protéines ont été utilisées pour perturber la structure des boues et dissoudre l'EPS.	Sesay et al. (2006)

1.5. Applications industrielles des EPS

La production microbienne d'exopolysaccharides (EPS) est un marché industriel encore inexploité (**Freitas et al., 2011**). Les EPS bactériens ont été largement utilisés dans des applications de grande valeur comme les produits ou procédés alimentaires, pharmaceutiques, médicaux et cosmétiques (**Freitas et al., 2011; Yildiz et Karatas, 2018**), où ils sont principalement utilisés comme épaississants, stabilisants, adhésifs et créateurs de structure en raison de leur comportement non-Newtonien et leur haute viscosité en milieu aqueux (**Aguilera et al., 2008 ; Freitas et al., 2011**).

Lorsqu'ils sont appliqués sur des aliments, ils doivent pouvoir conserver leurs propriétés lorsqu'ils sont incorporés dans des formulations où ils peuvent subir des changements importants de pH et de force ionique, ainsi que les effets d'autres ingrédients alimentaires. (**Aguilera et al., 2008; Freitas et al., 2011**).

L'EPS peut également être utilisé comme source d'oligosaccharides et de monomères de sucre, qui ont des applications à valeur ajoutée. Le fucose est un exemple de sucre rare difficile à obtenir et dont l'offre est inférieure à la demande du marché international. Il a été rapporté que des formulations contenant du fucose et des oligosaccharides contenant du fructose ont des propriétés qui améliorent leur utilisation en médecine (par exemple, comme agent anticancéreux ou anti-inflammatoire) ou cosmétique (comme agent anti-vieillesse) (**kumar et al., 2007**). Par conséquent, les polysaccharides riches en fucose (ou d'autres composants à valeur ajoutée), tels que le FucoPol, peuvent être considérés comme des sources de produits chimiques précieux (**Freitas et al., 2011**).

Les applications des EPS bactériennes incluent des domaines où de grandes quantités de polymères sont utilisées mais où une pureté plus élevée n'est pas requise. L'une des applications les plus importantes concerne les fluides de forage pour la récupération de pétrole, où la gomme de xanthane est le polysaccharide bactérien le plus largement utilisé en raison de sa grande capacité à augmenter la viscosité à de faibles concentrations (**Hamed et Belhadri, 2009**). En outre, des applications nouvelles/améliorées des polysaccharides extracellulaires sont à l'étude, notamment la chélation de composés toxiques (**Kazy et al., 2008**), la sédimentation de boues activées (**Lin et al., 2008**), l'incorporation de nanoparticules d'argile dans des mousses aqueuses pour supprimer l'évaporation de l'essence (**Sani et al., 2009**) et la production d'absorption élastique pour l'absorption chimique de l'agent de dioxyde de carbone. (**Park et al., 2008**) (**Tableau 4**).

Chapitre I: Généralités sur les exopolysaccharides

Tableau 4: Certains EPS microbiens et leurs applications

Biopolymère	Applications	Références
Cellulose	Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire comme fibre naturelle non digestible.	Fang et Catchmark (2015) Chawla et al. (2009)
Curdlane	Il est utilisé comme additif alimentaire pour améliorer la viscoélasticité, la stabilité et l'onctuosité des aliments. Il est également utilisé comme agent gélifiant et matrice d'immobilisation.	Chien et al. (2017)
Dextrane	Il est utilisé comme hydratant et épaississant dans les cosmétiques et ajouté aux produits de boulangerie et de confiserie pour améliorer la douceur ou la rétention d'humidité, pour empêcher la cristallisation et pour augmenter la viscosité, la rhéologie, la texture et le volume dans l'industrie alimentaire. En outre, il est utilisé comme microporteur dans les cultures de tissus/cellules.	Robyt et al. (2008) Li et al. (2017)
Emulsane	Il est utilisé dans de nombreux domaines industriels tels que la récupération du pétrole brut, les crèmes nettoyantes, la lotion, le savon, le shampoing et le dentifrice.	Choi et al. (1996)
Gellan	Il est utilisé comme additif alimentaire qui fonctionne comme stabilisant, épaississant, structurant et gélifiant tout usage dans une grande variété d'aliments. En outre, il est utilisé comme matrice de microencapsulation pour les bactéries lactiques	Liang et al. (2006) Bajaj et al. (2007)
Acide hyaluronique	Il est largement utilisé dans les produits alimentaires et cosmétiques.	Chen et al. (2014)
Levane	Il est utilisé pour la production de confiserie comme viscosifiant et stabilisant.	Patel et Prajapat (2013)

Chapitre II :

Les bacilles thermophiles

1. La Thermophilie

La température est une variable importante dans divers écosystèmes naturels. Elle est considérée en biologie comme un élément essentiel de classification. En conséquence, quatre groupes principaux sont déterminés en fonction des températures de croissance optimales : les psychrophiles qui ont une température optimale en dessous de 20 °C, les mésophiles qui se développent de manière optimale entre 20 et 45 °C, les thermophiles ayant une température optimale élevée et les hyperthermophiles ayant une température optimale très élevée (**Figure 2**).

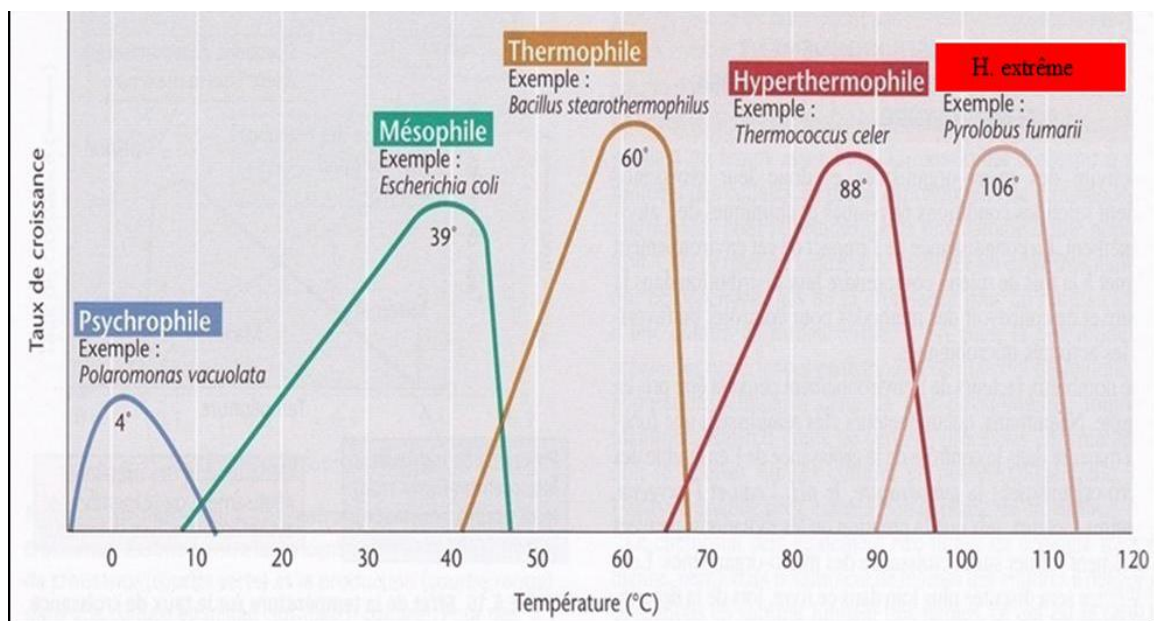


Figure 2: Effet de la température sur les taux de croissance de microorganismes (psychrophiles, mésophiles, thermophiles, hyperthermophiles et hyperthermophiles extrêmes) (**Madigan et Martinko, 2007**).

Les thermophiles sont un type de micro-organismes extrémophiles capables de se développer à des températures relativement élevées (**Kambourova et al., 2016**). En général, les micro-organismes dont la température de croissance optimale est comprise entre 50 et 80 °C sont appelés thermophiles, tandis que ceux qui se développent de façon optimale à des températures en dessus de 80 °C sont appelés hyperthermophiles (**Yildiz, 2019**). La majorité des hyperthermophiles appartiennent au domaine des Archaea. Parmi les Bactéries, quelques espèces peuvent être classées comme hyperthermophiles ; elles

appartiennent aux genres bactériens *Thermotoga* et *Aquifex* (Huber et al.,2000 ; Postec, 2005).

2. Les bactéries thermophiles

2.1. Les Biotopes chauds

Les biotopes chauds sont des environnements dans lesquels vivent les thermophiles. Ils sont généralement d'origine naturelle associés à des zones tectoniques actives mais peuvent également être d'origine artificielle (Maouchi et Medjedoub, 2020) (Figure 3).



Figure 3: Exemples de biotopes naturels chauds. A. Source d'eau chaude, Beppu, à la mer "Hell", Japon [1], B. Fumeur noir dans l'océan Atlantique [2], C. Source d'eau chaude, parc de Yellowstone, Etats-Unis [3], D. Geysier, Islande [4]

2.2. Définition des bactéries thermophiles

Les microorganismes thermophiles (du grec thermê, chaleur et philein, aimer) sont des microorganismes qui nécessitent des températures élevées pour se développer et se

multiplier (**Prescott et al., 2003 ; Alain et al., 2010**). Pour définir les thermophiles, plusieurs définitions ont été proposées. La plus reconnue est la suggestion de Thomas Brock, le microbiologiste à l'origine de la découverte des microorganismes thermophiles. Selon cette définition, un thermophile est un être vivant dont la température optimale de croissance se situe au-delà de 60°C. (**Alain et al., 2010**).

Karl Stetter a proposé une définition plus pratique et plus large et qualifie les organismes thermophiles comme tous les organismes qui se développent à des températures supérieures à 45°C. La dernière définition est intéressante car elle définit deux sous-catégories au sein des thermophiles:

- **Les thermophiles modérés:** les conditions optimales de croissance sont comprises entre 55 et 65°C.
- **Les hyperthermophiles:** la température optimale de croissance est supérieure à 80°C (**Madigan et Martinko, 2007 ; Alain et al., 2010**) (Tableau 5).

Tableau 5. Températures cardinales de certains microorganismes thermophiles et hyperthermophiles (**Prescott et al., 2003**).

Microorganismes	Température (°C)		
	Minimale	Optimale	Maximale
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	30	60-65	75
<i>Pyrococcus abyssi</i>	67	96	102
<i>Pyrodictium occultum</i>	82	105	110
<i>Pyrolobus fumarii</i>	90	106	113
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	60	80	85
<i>Syneccoccus eximius</i>	70	79	84
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	45	59	62
<i>Thermus aquaticus</i>	40	70-72	79

3. Les besoins nutritifs des bactéries thermophiles :

Les bactéries thermophiles ont des besoins différents de ceux des bactéries mésophiles. De nombreux auteurs ont montré que la croissance de ces bactéries nécessite notamment des vitamines et des acides aminés comme l'histidine, la méthionine, la thiamine et la riboflavine mais également le magnésium, le calcium et les sources nécessaires de carbone, d'azote et de phosphore (**Castonguay, 2005**). La culture mixte s'est avérée moins exigeante sur le plan nutritionnel que les cultures pures d'organismes individuels isolés de la culture mixte, cette observation a indiqué la possibilité d'une croissance symbiotique de micro-organismes thermophiles (**Sürücü, 1999**).

Il a été montré qu'avec une augmentation de la température d'incubation il y'a une augmentation des besoins nutritifs de certaines bactéries thermophiles. L'explication de ces résultats donnés par presque tous les auteurs est qu'à la température la plus élevée, la ou les enzymes responsables de la synthèse d'un ou de plusieurs métabolites essentiels, par exemple le composé X, subissent une activation thermique ce qui impose à l'organisme le besoin d'une source exogène de composé X avant que la croissance puisse se produire. Par exemple *B. coagulans*, souche 1039 a besoin de l'histidine, de la méthionine et de l'acide nicotinique pour croître à 55 °C mais pas à 36 °C ou 45 °C (**Campbell et Williams, 1953**).

4. Adaptation des thermophiles aux conditions des températures élevées

L'étude de la vie à haute température est relativement nouvelle, et malgré l'ensemble des connaissances acquises depuis une vingtaine d'années les mécanismes moléculaires d'adaptation à la thermophilie restent peu connus (**Postec, 2005**).

Les micro-organismes thermophiles se trouvent dans différentes branches de l'arbre de la phylogénie, c'est-à-dire les mécanismes d'adaptation aux hautes températures peut s'être produit indépendamment de plusieurs façons au cours de l'évolution (**Fujita et Kanehisa, 2005**).

Cette adaptation est évidente dans la composition de leurs structures cellulaires, ce qui signifie que non seulement les protéines sont stables à des températures supérieures à 80°C, mais aussi les lipides, les acides nucléiques et les métabolites de faible poids moléculaire (**Singlton, 1994 ; Postec, 2005**).

4.1. Les lipides et la membrane

La température de croissance peut affecter la composition en acides gras des membranes cellulaires bactériennes, ceci est démontré par la comparaison de la composition en acides gras de la membrane cytoplasmique d'un organisme cultivé à la température la plus basse avec la composition en acides gras de la membrane cytoplasmique du même organisme cultivé à la température la plus élevée (**Perry et al., 2004**).

Des études sur la composition des lipides membranaires montrent des différentes adaptations thermophiles des archées et des bactéries (**Postec, 2005**). Les lipides membranaires des archées ont des chaînes hydrocarbonées ramifiées fixées au glycérol par des liaisons éther plutôt que des acides gras connectés par des liaisons ester (**Stetter, 1999 ; Haki et Rakshit, 2003 ; Prescott et al., 2003 ; Postec, 2005**). Les liaisons éther sont plus résistantes à la température, à l'oxydation et à la dégradation enzymatique que les liaisons ester (**Postec, 2005**).

4.2. Les protéines et les acides aminés

Les protéines sont les principaux composants cellulaires qui déterminent la capacité des micro-organismes à se développer à des températures élevées (**Perry et al., 2004**). Il ne semble pas y avoir de mécanisme universel pour expliquer la thermostabilité des protéines chez les microorganismes thermophiles, mais plutôt plusieurs facteurs qui interviennent à des niveaux différents selon le microorganisme considéré (**Postec, 2005**).

4.3. Les acides nucléiques

Les microorganismes thermophiles posent un certain nombre de questions importantes car à leur température de croissance, la plupart des biomolécules, notamment les acides nucléiques, sont dénaturés et perdent leurs fonctions. Leurs mécanismes de thermostabilité sont mal connus (**Bousseboua, 2005**).

Les thermophiles subissent de nombreuses adaptations physiologiques et biochimiques pour maintenir leur intégrité et leurs fonctions cellulaires, dont les plus importantes sont :

- ✧ Une enzyme spécifique, la reverse gyrase, augmente fortement le nombre de liens topologiques entre les deux brins d'ADN.

- ✧ Réparation rapide d'ADN et la reconstitution des protéines endommagées par la chaleur.
- ✧ La présence d'une forte proportion de paires de bases GC et d'un grand nombre de nucléotides modifiés, stabilise les ARN de transfert et les ARN ribosomiaux des thermophiles, entraînant des interactions stables (**Forterre et al., 2007**).

5. Les Bacilles thermophiles

5.1. Définition

Les bacilles thermophiles sont des bâtonnets (de 3 à 8 μm de longueur et de 0,8 à 1,5 μm de diamètre) (**Marteinsson et al., 1996**) avec des extrémités rondes ou carrées, à Gram positif, mais certaines espèces peuvent être à Gram variable, ils peuvent se présenter individuellement ou en chaîne (**Safitri et al., 2020**). Les bacilles peuvent être des aérobies obligatoires ou facultatifs (**Safitri et al., 2020**). Ils présentent une réaction positive au test de la catalase, et La plupart des souches thermophiles sont fortement oxydase-positives (**Safitri et al., 2020**). Les colonies sont de couleur crème, blanche ou fauve et leur diamètre varie de moins de 0,2 mm à 4 mm (**Marteinsson et al., 1996**). Ils se développent généralement sur le glycérol, le galactose, le glucose, le maltose et le saccharose, mais ils ne poussent pas sur le sorbitol, la sérine et la thréonine. Très peu d'entre eux peuvent se développer sur l'arginine, l'asparagine, la glutamine et la phénylalanine (**Marteinsson et al., 1996**).

Les espèces de bacilles thermophiles sont nombreuses et ont été isolées dans une large variété d'habitats thermiques et non thermiques (**Almatawah, 1999**). Les environnements thermophiles sont généralement des champs de solfatares, des sources chaudes ou des sols chauffés par géothermie et des systèmes thermiques artificiels. La majorité des microorganismes thermophiles ne peuvent survivre que dans les systèmes thermiques naturels, mais *Bacillus* est omniprésent et peut être trouvé dans un certain nombre d'autres habitats qui ne sont chauffés que de manière transitoire et même dans des zones froides en permanence (**Marteinsson et al., 1996**).

5.2. Les différents groupes de bacilles thermophiles

Les bacilles thermophiles peuvent être divisés en deux types: les thermophiles obligatoires et les thermophiles facultatifs (aussi appelés micro-organismes thermotolérants) (Crabb *et al.*, 1975 ; Flint *et al.*, 2001).

5.2.1. Les thermophiles obligatoires

Les thermophiles obligatoires ne poussent qu'à des températures élevées (environ 40 à 68°C) et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus spp* (Flint *et al.*, 2001; Ronimus *et al.*, 2003).

5.2.2. Les thermophiles facultatifs

Les thermophiles facultatifs ont la capacité de se développer à des températures mésophiles et modérément thermophiles, selon la souche tels que *B. coagulans*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus smithii* (Bosma, 2015).

5.3. Taxonomie

Les bactéries du genre *Bacillus* font partie de la famille des Bacillaceae

Domaine: Bacteria ou Eubacteria

Phylum: Bacilli

Ordre: Bacillales

Genre: *Bacillus* (Logan, 2009)

Des études taxonomiques ont démontré que le genre *Bacillus* est très diversifié. Tout au long des années 1980, de nombreux débats ont porté sur la question de savoir si *Bacillus* était un genre unique ou pouvait être divisé en plusieurs genres (Garcia *et Coll.*, 1982), comme l'ont montré l'analyse de la séquence d'ARNr 16S et les études d'hybridation (Nazina *et al.*, 2001).

Le genre *Bacillus* est un grand groupe de bactéries Gram positives (à Gram-variable) aérobie et anaérobie facultatives, en forme de bâtonnet, formant des endospores (Nazina *et al.*, 2001; Logan, 2014). Ce genre comprend les bactéries thermophiles, psychrophiles, acidophiles et alcalophiles. Le genre *Bacillus* a connu de grands changements sur le plan

taxonomique et a été divisé en plusieurs nouveaux genres. Par exemple *Bacillus stearothermophilus* a été reclassé dans le nouveau genre *Geobacillus*, tandis que *Anoxybacillus pushchinoensis* a été reclassé en *A.flavithermus* (Nazina et al, 2001). Avant 2001, *A. flavithermus* pouvait être identifié par défaut comme *B.stearothermophilus* dans l'industrie laitière (Nasina et al, 2001; Burgess et al, 2010).

La taxonomie numérique basée sur l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, s'est avérée être un outil important pour l'identification des bacilles thermophiles. Mais d'autres techniques ont également été utilisées pour tenter d'approfondir la connaissance de ces souches : réactions d'agglutination avec des immuno-sérums de spores ou des antigènes ((O)) de cellules végétatives, analyse électrophorétique des estérases, analyse des lipides polaires, sensibilité aux antibiotiques ou à divers bactériophages, hybridation d'ADN et tests API-ZYM (Garcia et al., 1982).

Ces bactéries peuvent être classées selon la morphologie de la spore, étudiée par examen microscopique ou en fonction de plusieurs critères incluant le caractère respiratoire et fermentaire, la thermophilie,...etc (Guiraud , 2003).

Si on considère la spore, on distingue:

- ✧ Groupe 1 : spore ovale non déformante à paroi épaisse (exemple: *B.subtilis*).
- ✧ Groupe 2 : spore ovale déformante à paroi épaisse (exemple : *B. stearothermophilus*, *B. polymyxa*).
- ✧ Groupe 3 : spore sphérique déformante (exemple: *B.pasteurii* et *B.sphaericus*) (Guiraud, 2003)

5.5. Les caractéristiques générales des bacilles thermophiles

Le premier bacille thermophile a été isolé par Miquel en 1888, qui a décrit une souche thermophile sporulée isolée de la Seine. Par la suite, plusieurs souches de *Bacillus* ont été isolées et caractérisées à partir de sols, d'eaux usées et de produits alimentaires avariés, capables de se développer à 60°C ou plus (Cameron et Esty, 1926 ; Almatawah, 1999). Ces bactéries partagent de nombreuses caractéristiques biochimiques, phénotypiques et morphologiques, dont la plus importante est la capacité à former des endospores (Almatawah, 1999). La production des endospores permet à *Bacillus* de survivre à des conditions environnementales difficiles. Ces endospores sont très résistantes à la température élevée et aux radiations et sont viables pendant des périodes extrêmement longues (Safitri et al., 2020). Ces caractéristiques incluent également une composition

lipidique membranaire unique, des protéines membranaires thermostables et des taux de renouvellement plus élevés pour diverses enzymes protéiques (**Canganella, 2013**).

Les bacilles thermophiles sont caractérisés aussi par une croissance rapide (temps de génération d'environ 15 à 20 min) et une aptitude pour former facilement des biofilms (**Burgess et al., 2010**). De plus ils peuvent être considérés comme des usines cellulaires efficaces pour les EPS importants sur le plan industriel (**Yildiz, 2019**). Certaines souches bactériennes thermophiles, telles que *Bacillus thermantarcticus*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus thermodenitrificans*, *Geobacillus tepidamans*, peuvent synthétiser un EPS exceptionnellement thermostable qui commence à se décomposer à environ 280°C(**Padhan, 2021**).

Chapitre III :

La production d'exopolysaccharides

Par

**Les bacilles
thermophiles**

Les bactéries thermophiles appartenant aux genres de bacilles thermophiles obligatoires *Bacillus*, *Geobacillus*, *Brevibacillus* et *Aeribacillus*, le genre extrêmement thermophile *Thermus* et le genre hyperthermophile *Thermotoga* ont été signalés comme de bons producteurs thermophiles des EPS. Ils ont été isolés de sources chaudes continentales ou des sources marines peu profondes. L'espèce bactérienne hyperthermophile *Thermotoga maritima* a été isolée à l'origine des fonds marins chauffés par géothermie **(Huber et al., 1986 ; Rampelotto, 2016)**

Malgré une exploration approfondie des bacilles thermophiles en tant que source d'enzymes thermostables, les connaissances sur leur capacité à produire des EPS sont encore à leurs balbutiements. *Bacillus licheniformis* B3-15 et T14 **(Maugeri et al., 2002 ; Spanò et al., 2013)** et des souches appartenant au genre *Geobacillus* isolées de bouches hydrothermales peu profondes et de sources géothermiques terrestres **(Manca et al., 1996 ; Nicolaus et al., 2000, 2002, 2003, 2004 ; Kambourova et al., 2009)** sont décrits comme producteurs des EPS. *Aeribacillus pallidus* 418 produit deux EPS différents **(Radchenkova et al., 2013 ; Rampelotto, 2016)**.

Les exopolysaccharides microbiens (EPS) sont largement disponibles et peuvent être facilement préparés par fermentation. Une attention croissante est accordée à ces molécules en raison de leur rôle bioactif et de leur large éventail d'applications commerciales, qui incluent des utilisations en tant qu'additifs alimentaires (xanthane, alginate, dextran, glucomannane) et dans des applications non alimentaires comme le contrôle de la viscosité, gélification et floculation (xanthane, gélose, glucane) **(Sutherland, 1982)**. L'étude de la structure chimique, l'identification des substituants et des propriétés chimiques et physiques de ces molécules est essentielle pour comprendre leurs applications possibles et éventuellement les améliorer en utilisant des techniques de fermentation et des souches microbiennes génétiquement modifiées **(Sutherland, 1990)**. Quelques exemples d'extrêmophiles producteurs d'exopolysaccharides comprennent l'espèce *Methanosarcina* et certaines espèces de *Haloferax*, *Haloarcula* et *Sulfolobus* **(Antón, 1988; Sowers et al., 1988, Nicolaus et al., 1996)**.

1. La production des EPS par la bactérie *Paenibacillus tarimensis* REG

0201M

La souche bactérienne REG 0201M a été isolée d'un sol rhizosphérique de blé dur (*Triticum durum* L.), situé dans la région saharienne de Reggane (sud de l'Algérie. coordonnées géographiques : 26° 43' N, 0° 09' E). Cette souche bactérienne a été sélectionnée pour sa production importante et sa viscosité (par toucher avec une pipette Pasteur stérile) d'EPS gélifiant sur milieu Yeast Extract Sucrose Agar (YESA).

La production d'EPS a été étudiée en utilisant le milieu YEMA modifié contenant du saccharose (20 g L⁻¹) au lieu du mannitol. Le milieu YESA consistait en 0,4 g/L d'extrait de levure, 20 g/L de saccharose, 0,5 g/L de K₂HPO₄, 0,2 g/L de MgSO₄, 0,1 g/L NaCl et 15 g/L d'agar. Le pH a été ajusté à 6,8 et la croissance a été réalisée à 30°C pendant 7 jours (**Boukhelata et al., 2019**).

Le polysaccharide (EPS-R1) produit par REG 0201M a été extrait des boîtes de culture comme décrit par Freitas et al. (2009). Le bouillon de culture a été dilué avec de l'eau distillée et centrifugé à 4 °C (6000, 20 min) pour la séparation des cellules. Le surnageant a été filtré à travers un filtre à membrane en série (Sartorius). L'EPS a été précipité dans le surnageant exempt de cellules et de protéines en ajoutant de l'isopropanol froid dans un rapport de 3:1 (v/v). Par la suite l'EPS semi-purifié a été purifié par dialyse à l'aide d'une membrane 1KD MWCO contre de l'eau déminéralisée pendant 24 h. Après dialyse, les solutions de polymères ont été lyophilisées et pesées (**Boukhelata et al., 2019**).

L'analyse de la séquence du gène de l'ADNr 16S a montré que la souche REG 0201M appartenait à l'espèce *Paenibacillus tarimensis*. Dans un milieu gélosé au saccharose, 1.31 g de poids sec du polysaccharide par litre ont été produits. L'évaluation de la capacité d'absorption d'eau a montré que ce polysaccharide était capable d'absorber 1000 fois plus d'eau que son propre poids. Le poids moléculaire moyen déterminé par diffusion de lumière laser multiangle par chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC) était de 1.718×10^6 g mol⁻¹. L'analyse de la composition en monosaccharides par chromatographie échangeuse d'anions à haute performance (HPAEC) a montré la présence de fructose (77.67 %) comme sucre neutre principal, suivi du galactose (20.37 %), de l'arabinose (1.79 %) et du rhamnose (0.16 %). Sa charge globale déterminée par la mesure du potentiel Zeta était d'environ -35.27 ± 0.66 mV. Les principaux groupes fonctionnels ont été élucidés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

(FTIR) tandis que la morphologie de surface a été résolue par analyse au microscope électronique à balayage. De plus, les données rhéologiques ont révélé des propriétés de fluidification par cisaillement avec le même comportement général du polysaccharide étudié par rapport au xanthane. Ces résultats montrent le grand potentiel de ce polysaccharide, qui pourrait contribuer à promouvoir son utilisation dans diverses industries en remplaçant les polymères synthétiques (Boukhelata et al., 2019).

2. La production des EPS par la bactérie *Bacillus thermoantracticus*

La bactérie thermophile *Bacillus thermoantracticus* a été sélectionnée pour sa production importante des EPS. Elle produit deux exopolysaccharides (EPS1 et EPS2) avec des rendements allant jusqu'à 400 mg/litre. (Manca et al., 1996).

B. thermoantarcticus a été cultivé dans une culture statique de 1 litre (culture discontinue) et dans un fermenteur de 3 litres (Chemap) avec une agitation mécanique à basse vitesse (100 tr/min) et une aération de 20 ml min⁻¹ litre de bouillon⁻¹ (culture en fermenteur) à 65°C et pH 6,0. Le milieu de culture contenait 3 g/L de NaCl, 6 g/L de glucose, mannose ou saccharose et 0,1 g/L d'extrait de levure. Le milieu glucose additionné de 20 g/L d'agar sert à la préparation des plaques d'agar. Les colonies cultivées sur plaques ont été observées avec un stéréomicroscope, qui a montré la présence d'une couche mucilagineuse (Manca et al., 1996).

Les cellules ont été récoltées par centrifugation (9 800 x g pendant 20 min). La phase liquide a été traitée par 1 volume d'éthanol froid ajouté goutte à goutte sous agitation. La solution alcoolique a été maintenue à 18°C pendant une nuit puis centrifugée à 15 300 x g pendant 30 min. Le culot a été dissous dans de l'eau chaude (1/10 de volume initial) et la fraction soluble représentait 95 % des polymères totaux. La procédure de solubilisation a été répétée. La solution aqueuse finale a été dialysée contre de l'eau du robinet (pendant 48 h) et de l'eau distillée (pendant 20 h) puis lyophilisée et pesée. L'échantillon a été testé pour la teneur en glucides, en protéines et en acides nucléiques. Le polysaccharide a été purifié par chromatographie sur gel (Sephadex G-50 ; 2,5 x 50 cm) avec de l'acide H₂O-pyridine-acétique (500 : 5 : 2, en volume) comme éluant, avec des fractions de 5 mL recueillies à un débit de 6 mL h⁻¹, les fractions ont été soumises à une chromatographie échangeuse d'anions (DEAE-Sepharose CL-6B ; 1,5 par 40 cm) et éluées (fractions de 10 mL) avec 0,1 litre de H₂O et 1 litre d'un gradient de NaCl de 0 à 1 M à un débit de 12 mL h⁻¹ (Manca et al., 1996). Les fractions ont été testées qualitativement pour les glucides par un test ponctuel sur une chromatographie en couche mince impliquant

unspray d' α -naphtol et quantitativement par la méthode de **Dubois et al. (1956)**. Les fractions positives pour l' α -naphtol ont été regroupées, dialysées de manière exhaustive contre de l'eau, lyophilisées et pesées (**Manca et al., 1996**).

La fraction EPS a été produite avec tous les substrats testés, bien qu'un rendement plus élevé ait été obtenu en utilisant du mannose comme source de carbone et d'énergie. La teneur en EPS était proportionnelle à la biomasse totale. Sur une base pondérale, les EPS 1 et EPS 2 représentaient environ 27% et 71% (respectivement) de la fraction glucidique totale. L'EPS 1 est un hétéropolysaccharide sulfaté contenant du mannose et du glucose dans une proportion molaire relative de 1.0 et 0.7, respectivement. Alors que L'EPS 2 est un homopolysaccharide sulfaté contenant du mannose comme composant majeur (**Manca et al., 1996**). Les configurations absolues des hexoses se sont révélées être D pour les deux EPS. Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont confirmé la présence de α -D-mannose et de β -D-glucose dans l'EPS 1 et uniquement de α -D-mannose dans l'EPS 2. De plus, l'analyse par résonance magnétique nucléaire ^1H et l'analyse chimique ont indiqué la présence d'acide pyruvique dans l'EPS 2 (**Manca et al., 1996**).

La croissance microbienne et la production des EPS ont été réalisées quantitativement pour les cultures discontinues et fermentées en échantillonnant 10 mL de bouillon de culture à 0, 8, 16, 24 et 48 h. La production de biomasse a été suivie par la lecture de l' A_{450} . La production des EPS sur un bouillon de culture acellulaire a été testée par la méthode phénol-acide sulfurique avec du glucose comme étalon (**Dubois et al., 1956**).

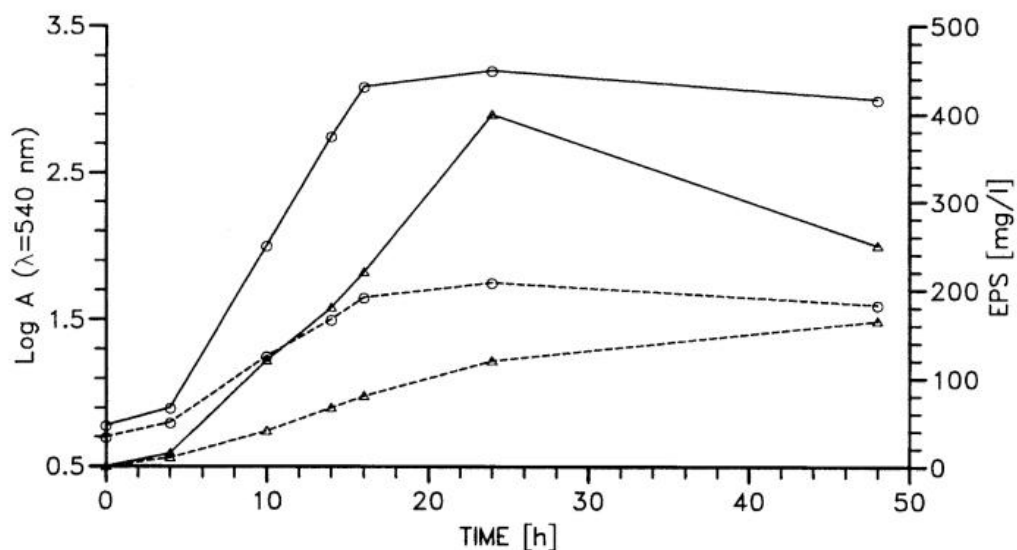


Figure 4: Courbe de croissance (o) et production de polysaccharides(Δ) par *B. thermoantarcticus* en culture discontinue (---) et culture en fermenteur (—). L'EPS représente le polysaccharide dissous dans le milieu de culture (Manca et al., 1996).

La production d'EPS a été réalisée dans un fermenteur de 3 litres et dans une culture discontinue de 1 litre. La courbe de production est illustrée à la **figure 4**. La production d'EPS dans les fermenteurs a atteint 400 mg/L en présence de mannose comme source de carbone, ce niveau était 2,4 fois supérieur à celui obtenu en culture discontinue. Dans ce dernier cas, la courbe atteint son maximum au cours de la phase stationnaire tardive, alors que dans les fermenteurs la production d'EPS augmente avec l'augmentation de la densité cellulaire et atteint son maximum au début de la phase stationnaire. Il convient de noter que les rendements en EPS étaient les plus élevés dans les fermenteurs lorsque les principaux paramètres physiologiques (O_2 , agitation et contrôle du pH) étaient également à leur optimum pour la production de biomasse. Le **tableau 6** montre les rendements d'EPS avec différentes sources de carbone dans le milieu. Le meilleur milieu minimal pour la formation d'EPS est celui contenant du mannose comme source de carbone, avec le saccharose, la teneur en EPS était la moitié de celle obtenue avec le mannose, et la pire était le glucose. Aucun effet sur la composition de l'EPS n'a été observé lorsque différents milieux minimaux ont été utilisés (Manca et al., 1996).

Tableau 6. La production des EPS dans un fermenteur^a et dans une culture discontinue (Manca et al., 1996) .

Source de carbone	Culture discontinue		Culture en fermenteur	
	Amt of EPS (mg lite ⁻¹)	OD ₅₄₀ ^b	Amt of EPS (mg lite ⁻¹)	OD ₅₄₀
	Mannose	165	0,750	400
Glucose	65	0,620	150	1,300
Sucrose	100	0,690	250	1,450

(a) La fraction glucidique totale a été déterminée par la méthode phénol-acide sulfurique

(b) OD₅₄₀, densité optique à 540 nm

3. La production des EPS par la bactérie thermophile *Geobacillus sp.* souche WSUCF1

Geobacillus sp. sont largement distribués dans les zones géothermiques comme les sources chaudes et les sources hydrothermaux, et ils effectuent généralement une croissance très rapide dans des milieux relativement simples avec des sources de carbone et d'azote peu coûteuses (Moriello et al., 2003; Gugliandolo, 2012; Panosyan et al., 2018).

Geobacillus sp. la souche WSUCF1 a été isolée à l'origine à partir d'un échantillon prélevé dans une installation de compostage à l'Université de l'État de Washington, Pullman, WA. (Rastogi et al., 2010). Pour la production d'EPS, il a été inoculé à partir d'une plaque de gélose et cultivé dans des flacons Erlenmeyer de 250 mL avec 50 mL de milieu liquide et cultivé dans un incubateur à agitation à 60 ° C, 180 tr/min pendant 24 h en tant que préculture. Ensuite, la préculture a été inoculée (5 %, v/v) dans des flacons Erlenmeyer de 1000 mL avec 300 mL de milieu liquide et cultivée dans un incubateur à agitation à 60 ° C, 180 tr/min pendant 24 h. Le milieu de base contient du glucose, 6,0

g/L ; de l'extrait de levure, 1,0 g/L et du NaCl, 3,0 g/L, et le pH initial a été ajusté à 7,0 par du NaOH 1 M. Le milieu a été stérilisé à 121°C pendant 15 min (**Wang et al., 2021**).

Les cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation à 6000 g pendant 15 min. Les protéines dans le surnageant acellulaire ont été précipitées en ajoutant du sulfate d'ammonium à 100 % (p/v) de saturation et éliminées par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min, suivie d'une dialyse contre de l'eau déminéralisée. Ensuite, un volume d'éthanol absolu réfrigéré (-20°C) a été ajouté goutte à goutte à un volume de surnageant sous agitation dans un bain de glace, et le mélange a été incubé à -20°C pendant une nuit. Le précipité sous forme d'EPS brut a été récolté par centrifugation (8000 g, 40 min), dissous dans une quantité minimale d'eau déionisée, puis dialysé contre de l'eau déionisée pendant 3 jours à 4 °C. L'EPS brut a été purifié en utilisant une colonne DEAE Sepharose CL-6B (1,9 x 60 cm). L'EPS brut (20 mg/mL) a d'abord été élué avec 100 mL d'eau déminéralisée, suivi d'un gradient discontinu de NaCl (100 mL à chaque concentration de NaCl) de 0,1 à 1,0 M avec un incrément de 0,1 M à un débit de 0,2 mL/min. Chaque fraction d'éluion (10 mL) a été collectée et la teneur en EPS a été dosée par la méthode phénol-acide sulfurique. Chaque fraction contenant un composant glucidique a été combinée, concentrée par évaporateur rotatif, puis purifiée davantage par colonne Sephadex G-50 (2,5 x 50 cm) en utilisant de l'eau désionisée comme éluant avec un flux de 0,5 mL/min. Les fractions avec EPS ont été regroupées et évaporées avant d'être appliquées pour une analyse caractéristique supplémentaire. (**Wang et al., 2021**).

Le glucose s'est avéré être la source de carbone optimale conduisant à une production d'EPS relativement supérieure par rapport aux autres mono et disaccharides et était la source de carbone dans cette étude. La production d'EPS a été analysée plus en détail à l'aide d'autres sources d'azote, comme la peptone et l'extrait de bœuf à 1,0 g/L dans un milieu de base (glucose 6,0 g/L, peptone ou extrait de bœuf 1,0 g/L et NaCl 3,0 g/L) (**Wang et al., 2021**).

La bactérie thermophile *Geobacillus sp.* WSUCF1 étudié fait partie d'un nombre limité d'espèces de *Geobacillus* rapportées capables de produire des quantités importantes d'EPS. 526 mg/L d'EPS ont été produits avec un rendement spécifique de 0,66 mg d'EPS/mg de poids sec de cellule dans un bioréacteur de 40 L à 60 °C. Deux EPS ont été obtenus et tous deux avaient une masse moléculaire d'environ 1000 kDa. Les analyses monosaccharidiques et spectrales ont révélé que l'EPS-1 a une structure linéaire de type glucomannane avec un squelette composé de mannose lié en α -(1,3) et de glucose lié en α -(1,6), et que l'EPS-2 a une structure linéaire de type mannane avec des monomères de

mannose liés en α -(1,3). Leurs spectres FTIR et RMN ont indiqué la présence de liaisons glycosidiques de type a dans une structure linéaire, et l'analyse XRD a indiqué un faible degré de cristallinité de 0,11 (EPS-1) et 0,27 (EPS-2). EPS-1 et EPS-2 ont démontré des températures de dégradation élevées de 319 °C et 314 °C, respectivement, et une non-cytotoxicité pour les cellules HEK-293 à 2 et 3 mg/mL, respectivement. De plus, les deux ont montré des activités antioxydantes (Wang et al., 2021).

La teneur en glucides du culot a été dosée par la méthode phénol-acide sulfurique en utilisant le glucose comme étalon (Dubois et al., 1956). La teneur en protéines a été estimée à l'aide du réactif de Bradford avec de l'albumine de sérum bovin comme étalon (Bradford, 1976). La teneur en acides nucléiques a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 à la longueur d'onde de 260 nm. La même procédure a également été réalisée en utilisant un milieu nonensemencé comme témoin. Les teneurs en glucides, protéines et acides nucléiques de l'EPS ont été calculées en soustrayant les valeurs correspondantes du milieu blanc si nécessaire (Wang et al., 2021) (Figure 5).

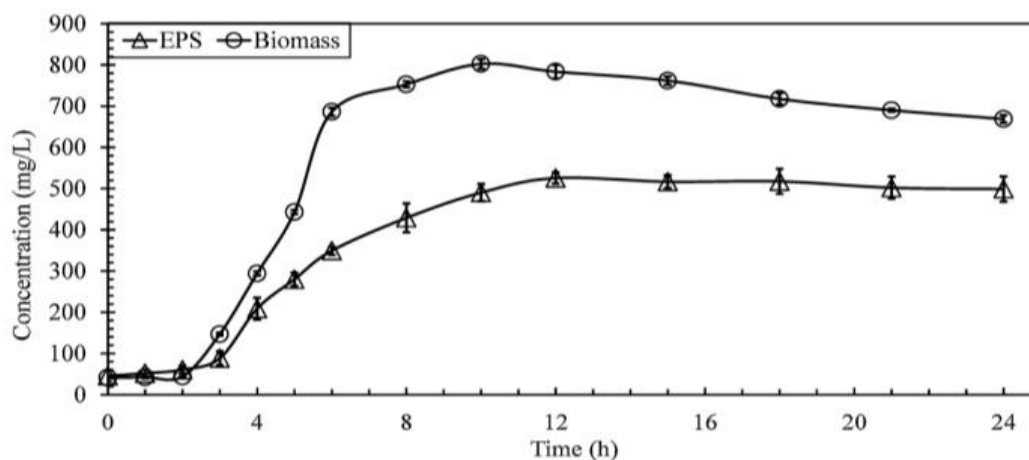


Figure 5. Évolution temporelle de la croissance et de la production d'EPS par WSUCF1 en bioréacteur. Symboles : Biomasse totale (cercles) ; EPS (triangles). La biomasse est transférée sous forme de concentration en poids sec cellulaire dans le milieu de culture. Les valeurs sont des moyennes de trois répétitions avec des barres d'erreur standard affichées, sauf lorsqu'elles sont plus petites que les symboles (Wang et al., 2021).

4. La production des EPS par les bactéries thermophiles *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 et *Geobacillus toebii* ArzA-8.

Les écosystèmes thermaux, y compris les sources géothermiques, ont été identifiés comme sources de thermophiles producteurs d'EPS. Parmi les seize bacilles thermophiles isolés des sédiments prélevés à la source géothermique d'Arzakan, en Arménie, deux meilleures souches productrices d'EPS ont été identifiées sur la base de l'analyse de la séquence du gène ARNr 16S et des caractéristiques phénotypiques, et désignées comme *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 et *Geobacillus toebii* ArzA-8 (Panosyan et al., 2018).

La production des EPS a été étudiée dans le milieu A additionné de fructose ou de saccharose à la place de glucose, le pH a été ajusté à 7,0 et la température de l'incubation est de 65°C. Les cellules ont été cultivées dans le milieu A jusqu'à la phase stationnaire de croissance, puis elles ont été éliminées par centrifugation (9800g, 20 min à 4°C). Le surnageant résultant a été traité avec un volume égal d'éthanol froid, la solution a été maintenue à -18 °C pendant une nuit à 15000 g pendant 30 min à 4°C le culot a été récupéré et dissous dans de l'eau chaude et dialysé puis il a été lyophilisé et pesé (Panosyan et al., 2018).

La production d'EPS sous différentes durées, températures et compositions de milieu a été étudiée. Les rendements d'EPS spécifiques les plus élevés (0,27 g g⁻¹ et 0,22 g g⁻¹ de cellules sèches pour les souches *G. thermodenitrificans* ArzA-6 et *G. toebii* ArzA-8, respectivement) ont été observés après 24 h lorsque le fructose a été utilisé comme seule source de carbone. L'EPS purifié présentait une masse moléculaire élevée : 5 x 10⁵ Da pour *G. thermodenitrificans* ArzA-6 et 6 x 10⁵ Da pour *G. toebii* ArzA-8. La composition chimique et la structure des biopolymères, déterminées par GC-MS, HPAE-PAD et RMN, ont montré que les deux EPS sont des hétéropolymères constitués de mannose comme unité monomère majeure (Panosyan et al., 2018).

La croissance cellulaire des deux souches a été déterminée en mesurant la densité optique (DO) à λ 540 nm et a atteint un maximum entre 10 et 18 heures d'incubation. Une tendance similaire a été montrée par la synthèse des EPS qui a été déterminée par précipitation à l'éthanol des polysaccharides. Pour les deux souches, la production d'EPS a commencé au milieu de la phase de croissance exponentielle et a atteint le niveau maximum (96,8 et 96,28 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pour *G. thermodenitrificans* souche ArzA-6 et *G. toebii*

souche ArzA-8, respectivement) à la phase stationnaire de la culture. Ainsi, la production d'EPS a augmenté avec la production de biomasse microbienne, indiquant une production liée à la croissance. La production maximale d'EPS a été atteinte en un temps significativement plus court que pour les processus mésophiles correspondants (Panosyan *et al.*, 2018) (Figure 6).

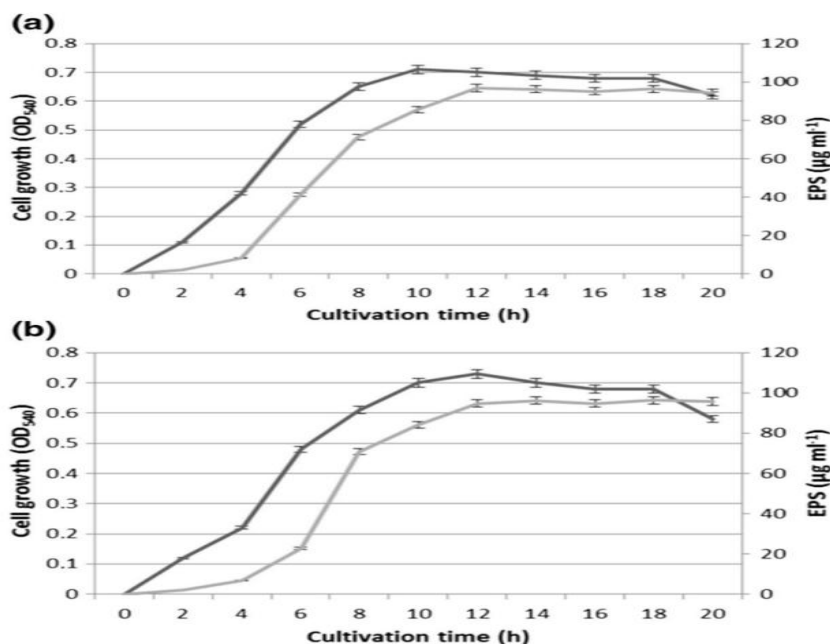


Figure 6: Évolution temporelle de la croissance et de la production d'EPS par les souches *G. thermodenitrificans* ArzA-6 (a) et *G. toebii* ArzA-8(b) à 65 °C, pH 7, 240 tr/min dans le milieu A. Des échantillons ont été prélevés à 2 h d'intervalle et dosé pour la croissance (ligne noire) et la teneur en EPS (ligne grise) (Panosyan *et al.*, 2018).

5. La production des EPS par la bactérie thermophile *Aeribacillus pallidus* 418

La souche *Aeribacillus pallidus* 418 a été isolée des sources hydrothermales en Bulgarie. Cette souche a été cultivée dans le milieu de base contenant : (NH₄)₂ HPO₄, 0,1% ; MgSO₄, 0,01% ; extrait de levure, 0,01% ; KCl, 0,02 % ; et thiamine, 0,00001%. Du saccharose (0,6%) a été ajouté comme source de carbone. Le pH a été ajusté à 7,2 et la température d'incubation est de 55 °C (Radchenkova *et al.*, 2013).

Les cellules ont été éliminées par centrifugation (4 000 tr/min, 20 min) en phase stationnaire tardive. L'EPS dans le surnageant a été précipité par un volume égal d'éthanol froid ajouté goutte à goutte sous agitation dans un bain de glace, maintenu à -18 ° C pendant une nuit, puis centrifugé pendant 30 min à 13 000 tr/min, 4 °C. Les culots ont été lavés deux fois avec de l'éthanol et dissous dans de l'eau chaude, dialysés contre de l'eau distillée et mesurés après séchage à 105°C. Les échantillons ont été testés pour la teneur en glucides, en protéines et en acides nucléiques. La fraction EPS recueillie à partir de la souche 418 a été purifiée par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-Sepharose™ CL-6B. Six milligrammes d'EPS ont été chargés sur une colonne (1,6 x 80 cm) et élués avec 360 mL d'eau, suivi de 200 mL d'un gradient linéaire de NaCl 0-1 M à un débit de 25 mL/h. Des fractions (4 mL chacune) ont été recueillies et analysées pour la teneur en glucides, en protéines et en ADN. Le poids moléculaire a été déterminé par filtration sur gel sur une colonne Sepharose CL-6B en utilisant des dextrans de différents poids moléculaires (200, 500 et 2 000 kDa) comme étalons (**Radchenkova et al., 2013**).

La production des exopolysaccharides la plus élevée a été établie pour la souche 418, y compris les propriétés phylogénétiques et phénotypiques la rattachent à l'espèce *A. pallidus*. Cette souche 418 produit deux exopolysaccharides différents, EPS 1 électroneutre et EPS 2 chargé négativement, dans un rapport pondéral relatif de 3 :2.2 a été établie. Il s'agissait d'hétéropolysaccharides composés d'une grande variété inhabituelle de sucres (six pour EPS 1 et sept pour EPS 2). Six des sucres étaient communs aux deux EPS. Le sucre principal de l'EPS 1 était également le mannose (69,3 %), de plus petites quantités de glucose (11,2 %), de galactosamine (6,3 %), de glucosamine (5,4 %), de galactose (4,7 %) et de ribose (2,9 %) ont également été identifiées. Le sucre principal de l'EPS 2 était le mannose (33,9 %), suivi du galactose (17,9 %) et du glucose (15,5 %) (**Radchenkova et al., 2013**).

La composition du milieu et les paramètres physicochimiques pour la production d'EPS par *A. pallidus* 418 ont été optimisés dans des flacons agités. Pour évaluer l'effet de la source de carbone sur la production d'EPS, *A. pallidus* 418 a été cultivé dans le milieu de base, dans lequel 12 sucres différents étaient présents comme seule source de carbone à une concentration de 0,6 %. Aucune croissance n'a été constatée dans les milieux testés avec cinq sucres (arabinose, galactose, lactose, ribose et raffinose). La biomasse finale et le rendement en EPS après 40 heures de croissance étaient les plus élevés dans le milieu contenant du maltose (0,75 mg/mL et 66 µg/mL, respectivement ; **Figure 7**). Le rendement le plus élevé d'*A. pallidus* 418 d'EPS a été établi dans un milieu contenant 0,2 % de NH₄Cl. Alors que le maltose et le chlorure d'ammonium étaient les meilleures sources de carbone et d'azote (**Radchenkova et al., 2013**).

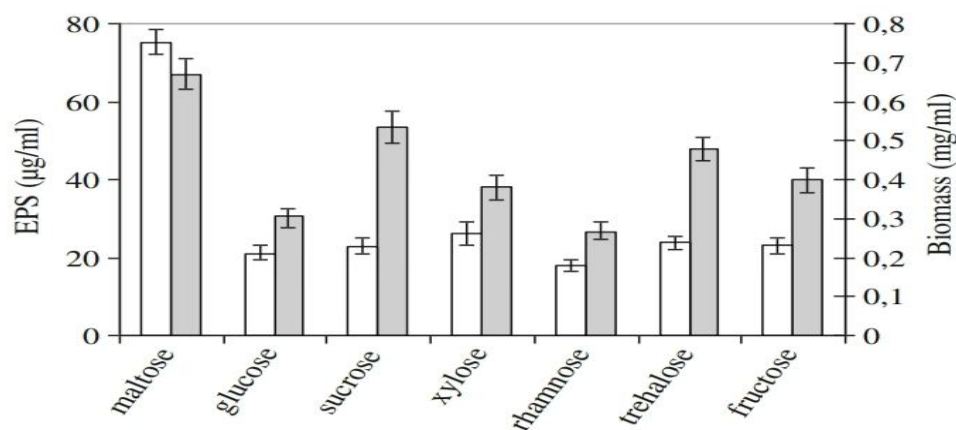


Figure 7: Effet de la source de carbone sur la production de biomasse (barres blanches) et d'EPS (barres grises) par *A. pallidus* 418 dans un milieu de base additionné de différents sucres. 1 maltose, 2 glucose, 3 saccharose, 4 xylose, 5 rhamnose, 6 tréhalose, 7 fructose (**Radchenkova et al., 2013**).

L'évolution temporelle de la croissance et de la production d'EPS a été suivie dans un fermenteur de 1L à 600 tr/min et une aération de 1,2 vvm sur une période de 30 h (**Figure 8**) dans le milieu optimisé. Au cours de la fermentation discontinue de la souche 418, la production d'EPS a commencé au début de la phase exponentielle et s'est poursuivie au début de la phase stationnaire, atteignant une valeur de 130 µg/mL à la 13^{ième} heure (**Radchenkova et al., 2013**)

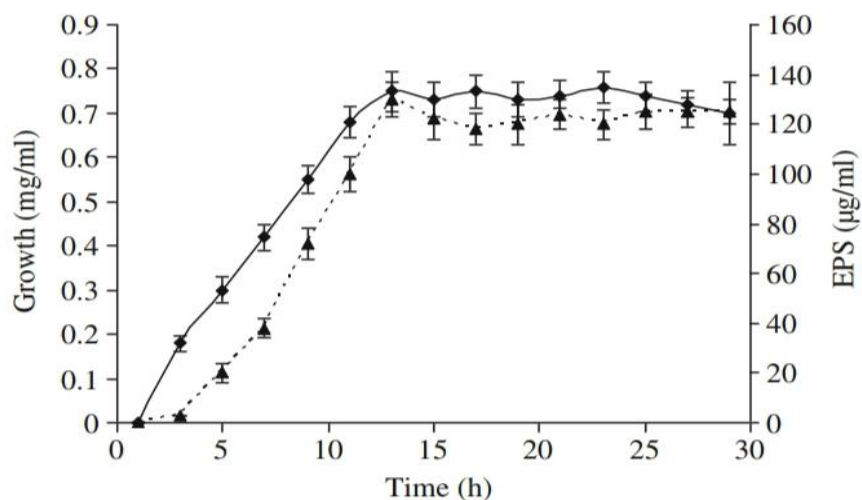


Figure 8: Évolution temporelle de la croissance (losanges) et de la production d'EPS (triangles) par *A. pallidus* 418 dans le milieu optimisé en fermenteur de 1 L, débit d'air 1,2 vvm, 600 rpm (Radchenkova et al., 2013).

6. La production des EPS par *Geobacillus* sp. 4004

Une souche thermophile appartenant au genre *Geobacillus* capable de produire un polysaccharide extracellulaire (EPS) a été isolée du sable marin à Maronti, près de Sant'Angelo (Ischia), nommée souche 4004. La croissance et la production de polysaccharides par la souche 4004 ont été réalisées dans un fermenteur de 3 L (Chemap) en utilisant du saccharose ajouté au milieu minimal, avec une agitation mécanique faible (100 tr/min) et un flux d'aération de 20 mL min⁻¹ par litre de bouillon à 60 °C et pH 7,2 (Schiano Moriello et al., 2003).

En atteignant la phase stationnaire, les cellules ont été éliminées par centrifugation. Le surnageant résultant a été traité avec un volume égal (3 litres) d'éthanol froid ajouté goutte à goutte sous agitation. La solution alcoolique a été maintenue à -18°C pendant une nuit puis centrifugée à 8 000 g pendant 40 min. L'EPS précipité a été dissous dans de l'eau distillée, dialysé contre de l'eau du robinet (72 h) puis il a été lyophilisé (Schiano Moriello et al., 2003).

Trois fractions ont été obtenues, EPS2 et EPS3 contenaient au moins 95% de monosaccharides tandis que EPS1 contenait une trace de glucides. L'analyse quantitative des sucres de l'EPS a révélé la présence d'hexoses D, mannose: glucose: galactose dans

un rapport relatif de 0,5:1,0:0,3 dans l'EPS1, mannose: glucose: galactose dans un rapport relatif de 1,0 : 0,3 : trace dans EPS2, et galactose : mannose : glucosamine : arabinose dans un rapport relatif de 1,0 : 0,8 : 0,4 : 0,2 dans EPS3. La masse moléculaire moyenne d'EPS3 était de 1×10^6 Da. EPS3 a été utilisé pour une analyse spectroscopique RMN plus poussée. Les spectres ^1H - et ^{13}C -RMN du polymère purifié ont montré qu'il existe cinq résidus différents dans l'unité saccharidique répétitive : deux d'entre eux avec une configuration gluco-galacto et trois avec une configuration mannane. L'un des résidus est un acétamido-sucre, et au moins un acide uronique est présent (**Schiano Moriello et al., 2003**)

Les masses moléculaires des échantillons ont été estimées par gel filtration sur colonne de Sépharose CL-6B et par centrifugation en gradient de densité avec un gradient de saccharose de 0 à 50 % (p/v). Les sucres ont été analysés par hydrolyse des fractions polysaccharidiques avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) 2 M à 120 °C pendant 2 h. Le mélange de sucre résultant a été identifié par détection ampérométrique pulsée par échange d'anions à haute pression (HPAE)-PAD en utilisant des standards pour les courbes d'identification et d'étalonnage (**Schiano Moriello et al., 2003**)

7. La production des EPS par la bactérie *Brevibacillus thermoruber* souche 423

La bactérie *Brevibacillus thermoruber* souche 423 a été utilisée comme organisme modèle pour étudier les mécanismes biologiques et l'organisation du génome entier des bactéries thermophiles productrices des EPS (**Yildiz et al., 2014**).

La souche 423 de *B. thermoruber* est la meilleure productrice des EPS. Elle a été isolée d'une source chaude près du village de Gradechnitsa (N 41683°; E 23183°), région de Blagoevgrad, sud-ouest de la Bulgarie (température de l'eau de source 59°C, pH 6,5).

Le criblage des isolats thermophiles est réalisé dans le milieu de base suivant (g L^{-1}) : 6 maltose ; 1 peptone de caséine ; 0,1 MgSO_4 ; 0,2 KCl; 0,4 extrait de levure et 0,0001 thiamine, pH 7. Parmi les études de production et d'optimisation d'EPS, le milieu de base a été supplémenté en oligo-éléments pour donner un milieu semi-défini (SD) de composition (g L^{-1}) suivante : six maltose; une peptone de caséine ; 0,1 MgSO_4 ; 0,2 KCl; 0,4 extrait de levure ; 0,00044 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,00005 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,00036 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,00005 $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,0023 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0001 thiamine, pH 7. La composition du

milieu optimisé (MO) était (g L^{-1}) : 18 maltose ; 1 peptone de caséine ; 0.1 MgSO_4 ; 0.2 KCl ; 0.4 extrait de levure; 0.00044 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.00005 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.00036 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.00005 $\text{CoSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0.0023 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.0001 thiamine, pH 6.5 (Yildiz et al., 2014).

Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4602 g pendant 10 min et les phases surnageantes ont été traitées avec un volume égal d'éthanol à 4°C ajouté goutte à goutte sous agitation, maintenu à -18°C pendant une nuit, puis centrifugé à 13523 g à 4°C pendant 30 min à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée. Les culots ont été dissous dans de l'eau distillée chaude, dialysés contre de l'eau distillée pendant 24 heures, puis lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur Lyovac GT2 réglé à -60 ° C et à basse pression (environ 60 mTorr).

La purification de l'EPS a été réalisée à l'aide d'une chromatographie échangeuse d'anions (DEAE-Sepharose CL-6B, 1.5 x 40 cm) éluée avec 0.1L H_2O et 0.5L NaCl gradient de 0 à 1 mol L^{-1} avec un flux de 0.3 mL min L^{-1} . Le volume de chaque fraction était de 10 mL. Les fractions ont été testées pour les teneurs en glucides, en protéines et en acides nucléiques.

Les isolats thermophiles ont été criblés, puis la croissance et la production d'EPS de la souche 423 de *Brevibacillus thermoruber*, la meilleure productrice, ont été étudiées sous différentes sources de carbone et d'azote, température, pH et taux d'agitation. La caractérisation rhéologique a montré que l'EPS se comportait comme un fluide newtonien typique et que la viscosité de la solution d'EPS augmentait avec l'augmentation de la concentration en ions Ca^{2+} . La caractérisation chimique par CCM, GC-MS, FT-IR et RMN a indiqué une structure hétéropolymère avec le glucose comme unité monomère principale. La biocompatibilité élevée des fractions d'EPS pures a suggéré leur utilisation potentielle dans des applications biomédicales (Yildiz et al., 2014).

La croissance cellulaire a été surveillée en mesurant la densité optique à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda35 UV/Vis. Pour convertir les valeurs de densité optique (DO) en concentration de biomasse en grammes de poids de cellules sèches par litre. La teneur en glucides a été mesurée à l'aide de la méthode phénol/acide sulfurique en utilisant le glucose comme étalon (Dubois et al. 1956). La concentration en protéines a été déterminée par le test de Bradford en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme étalon (Bradford, 1976). La teneur en acide nucléique des échantillons est déterminée par l'absorbance de la lumière UV à 260 nm (Yildiz et al., 2014).

Pour les cultures en bioréacteur, un multi-fermenteur avec un environnement bien contrôlé de pH et de température a été utilisé et les cultures ont été effectuées dans des conditions optimisées. À un moment donné, des échantillons ont été analysés pour déterminer les profils de biomasse et de concentrations d'EPS. Le taux de croissance spécifique maximum de la culture a été déterminé à partir de la pente du $\ln x$ en fonction du temps tracés dans la phase exponentielle en utilisant la régression linéaire comme $0.2814 \pm 0.0067 \text{ h}^{-1}$. Pour déterminer les rendements en EPS, des échantillons ont été prélevés à différents stades de la croissance et l'EPS a été purifié à partir des surnageants de culture par précipitation à l'alcool et dialysé. La masse de cellules sèches et les rendements en EPS ont été étudiés aux phases de croissance pré-exponentielle, exponentielle, pré-stationnaire et stationnaire qui ont duré c. 2–5, 5–12, 12–16 et 16–24 h des fermentations respectivement (Yildiz et al., 2014) (Figure9).

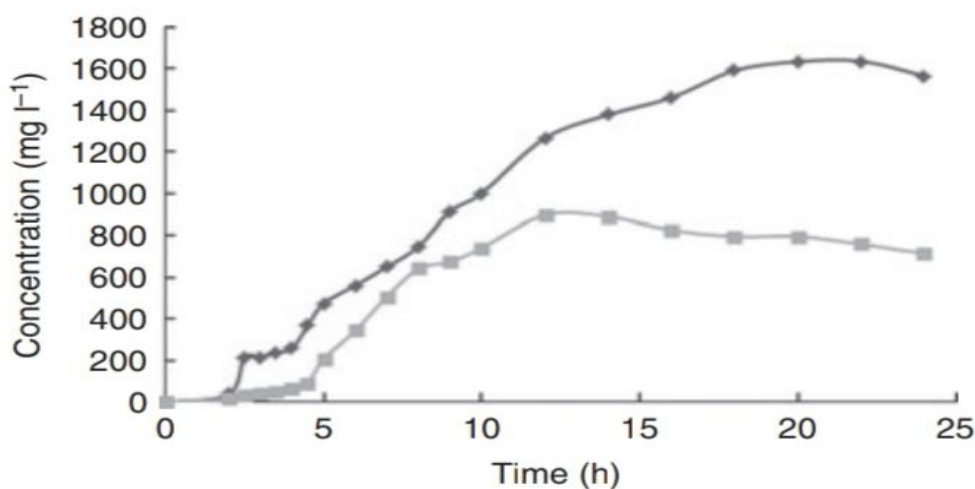


Figure 9: Évolution dans le temps de la formation de la biomasse (♦) et de la production d'exopolysaccharides (♦) des cultures en bioréacteur *Brevibacillus thermoruber* souche 423 (Yildiz et al., 2014).

8. La production des EPS par la bactérie thermophile *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72

Plusieurs bactéries marines produisent des EPS comme stratégie de croissance, parmi lesquelles la bactérie *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72 (Arena et al., 2009). La souche B3-72 de *Geobacillus thermodenitrificans*, isolée d'une source marine peu profond de l'île Vulcano (îles Eoliennes, Italie) à Porto Levante a été cultivée dans un milieu minéral liquide plus saccharose 0,6 % (p/v) à 65 °C et pH 7,0 (Nicolaus et al., 2000 ; Arena et al., 2009).

La souche B3-72 a produit des cultures en flacons très visqueuses à une concentration de glucose ou de saccharose de 0,6 g/L. La production commence à la fin de la phase exponentielle de croissance et se poursuit pendant la phase stationnaire. La concentration la plus élevée en polysaccharide récolté après 3 jours de culture était d'environ 70 mg/L. Après centrifugation, le surnageant a formé un précipité avec de l'éthanol. Le premier précipité d'éthanol n'a pas pu être complètement dissous dans de l'eau distillée même après chauffage à 100°C pendant 30 minutes. Ce culot a été collecté et appelé "fraction insoluble" qui représente 10% de la fraction glucidique totale. La fraction soluble a été testée pour les glucides à 75 %, les protéines à 5 % et l'acide nucléique à 3 % (Nicolaus et al., 2000).

Les cellules en phase stationnaire de croissance ont été réalisées par centrifugation (9800 x g, 20 min à +4 °C). La phase liquide est traitée par 1 volume d'éthanol froid ajouté goutte à goutte sous agitation. La solution alcoolique a été maintenue à -18°C pendant une nuit puis centrifugée à 15 000 xg pendant 30 min. Le culot a été lavé deux fois avec de l'éthanol et dissous dans de l'eau chaude, dialysé contre de l'eau distillée et lyophilisée. Les propriétés rhéologiques ont été analysées en étudiant la viscosité spécifique (η) et la température de dégradation au moyen d'une analyse thermogravimétrique de l'EPS-2. Les mesures de la viscosité spécifiques en fonction de la concentration de la solution aqueuse du polysaccharide ont été effectuées à 30°C à l'aide de viscosimètres à niveau suspendu Cannon-Ubbelohde 75. L'analyse thermogravimétrique a été réalisée à l'aide d'un instrument Mettler Toledo Star System. L'échantillon (5 mg) a été chauffé de 30 à 400°C à une vitesse de chauffage de 20°C/min sous azote (Arena et al., 2009).

La fraction polymérique a été dessalée sur Sephadex G-50 avec un rendement de 70% puis chromatographiée sur DEAE-Sepharose CL-6B avec un rendement de 94%. Deux

fractions ont été obtenues : la première (EPS1) élue seulement dans l'eau et la seconde (EPS2) dans 20% de NaCl. En poids, EPS1 et EPS2 représentaient respectivement d'environ 20 et 80 %. Les deux fractions ont été dosées pour la teneur en glucides et en protéines; EPS1 et EPS2 contenaient au moins 80 % de sucres et moins de 3 % de protéines (Nicolaus *et al.*, 2000).

9. La production des EPS par la souche *Bacillus licheniformis* WSF-1

Jenny Angel *et al.* (2018) ont isolé la souche *Bacillus licheniformis* WSF-1 d'une usine de distillerie de sucre, La souche a été cultivée dans un milieu minéral liquide additionné de glucose à 1 % à 37 °C. Pour la production d'EPS, les milieux suivants ont été utilisés en g/L : K₂HPO₄, 1,0 ; KCl, 0,5 ; Fe₂ (SO₄), 30,01; MgSO₄ x 7H₂O, 0,5 ; NaNO₃, 3,0 ; saccharose (12%) ; (pH, 7,0). Le milieu de production a été additionné d'un inoculum bactérien cultivé pendant la nuit et agité à 200 tr/min, 37 °C pendant 5 jours. Le bouillon de culture a été initialement dilué dans de l'eau distillée (1:10) pour réduire la viscosité du milieu et les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 8000 tr/min pendant 10 min à 4 °C. L'EPS a été précipité à 4 °C en ajoutant trois volumes d'éthanol anhydre froid à un volume de surnageant acellulaire et le mélange a été incubé pendant une nuit. L'EPS précipité a été lavé avec de l'eau distillée pour éliminer les impuretés, séché à l'air et la biomasse sèche a été estimée. L'EPS obtenu a été purifié partiellement par dialyse avec la membrane de dialyse 50 puis lyophilisé.

Une culture de 48 h a été identifiée comme l'âge optimal de l'inoculum pour la production d'EPS et le saccharose à 25% a été sélectionné comme la meilleure source de carbone, produisant 2,9 g/mL d'exopolysaccharide. La teneur totale en glucides de l'EPS a été déterminée par la méthode de l'acide sulfurique-UV et les composants monomères majeurs ont été déterminés en tant que fructose et glucose par HPLC, suivi d'une analyse FT-IR. La stabilité thermique de l'EPS a été évaluée par une analyse thermogravimétrique qui a montré une stabilité thermique élevée de 219,4 °C (Jenny Angel *et al.*, 2018).

10. La production des EPS par la bactérie thermophile *Geobacillus tepidamans* V264

La souche thermophile (V264) produisant des EPS a été isolée de la source thermale de Velingrad, en Bulgarie. La souche V264 a montré une similarité de 98 % dans la séquence du gène de l'ARNr 16S avec *Geobacillus tepidamans*. Le maltose s'est avéré être la source de carbone la plus appropriée pour la production d'exopolysaccharides. La production maximale d'EPS est atteinte au début de la phase stationnaire. La production d'EPS la plus élevée de 111.4 mg L⁻¹ a été étudiée à 60 °C et à pH 7,0 dans des cultures discontinues en fermenteur à 300 tr/min et dans un bioréacteur de 0,75 L avec un volume de travail de 0,35 L. Le liquide de culture a été inoculé avec une suspension à 1,5 % (v/v) de cellules en phase exponentielle. Les vitesses d'agitation testées dans le fermenteur étaient de 100, 200, 300 et 400 tr/min. Le débit d'air a été réglé à 1:1 (v/v) (**Kambourova et al., 2009**).

Les cellules ont été recueillies par centrifugation dans une phase stationnaire de croissance. Le surnageant a été traité avec un volume égal d'éthanol absolu froid ajouté goutte à goutte sous agitation dans un bain de glace, maintenu à -18°C pendant une nuit puis centrifugé à 13 000 g pendant 30 min. Les culots ont été lavés deux fois avec de l'éthanol et dissous dans de l'eau chaude, dialysés contre de l'eau distillée et lyophilisés. Les échantillons ont été testés pour la teneur en glucides, en protéines et en acides nucléiques. (**Kambourova et al., 2009**).

L'EPS purifié exprimait un poids moléculaire élevé et était très stable à haute température, montrant une dégradation à 280°C. La composition chimique du biopolymère, mesurée à l'aide d'un détecteur ampérométrique pulsé à échange d'anions à haute pression (HPAE-PAD), a montré que le glucose était son composant majeur. Le polysaccharide a également été étudié par des méthodes spectroscopiques (RMN ¹H et ¹³C) démontrant la complexité structurale de ce biopolymère (**Kambourova et al., 2009**) (**Figure 10**).

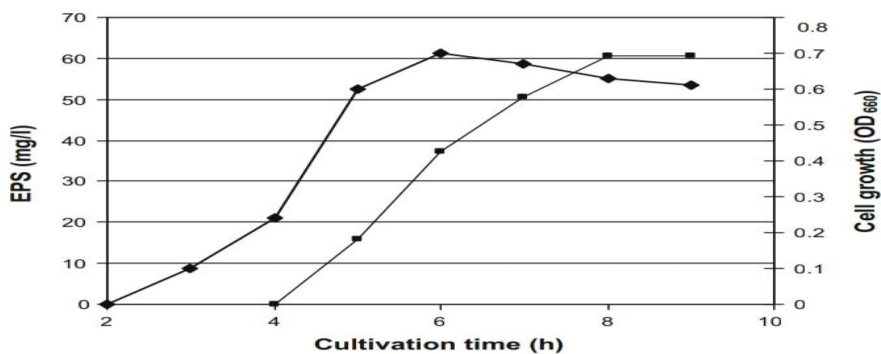


Figure 10: Évolution dans le temps de la production d'EPS à partir d'une souche V 264 à 60 C, pH 7,0, 240 rpm dans un milieu défini. Des échantillons ont été prélevés à 1 h d'intervalle et testés pour la croissance (♦) et la teneur en polysaccharides. (◆) (Kambourova et al., 2009).

11. La production des EPS par la bactérie thermophile *Geobacillus sp.*

4001

Le micro-organisme thermophile *Geobacillus sp.* 4001, décrit comme aérobie ou anaérobie facultatif, forme des endospores avec des températures optimales de croissance comprises entre 60 et 80 °C, a été isolé de sources marines chaudes autour d'Ischia et de cheminées hydrothermales dans le golfe de Naples (Nicolaus et al., 2002).

La production des EPS à partir de souches 4001 a été étudiée en utilisant une fermentation discontinue en utilisant tous les milieux minimaux. La température a été maintenue à la valeur optimale de croissance (65 °C), le pH a été ajusté à 7,6 au début de la culture et mesuré mais non contrôlé au cours de l'expérience. Des échantillons (20 mL) ont été prélevés à intervalles réguliers pour mesurer la croissance et la production d'EPS. Pour récupérer des EPS, les cellules ont été récoltées pendant la phase stationnaire de croissance par centrifugation (1L, 9800 g, 20 min). Les phases surnageantes ont été traitées avec 1 volume d'éthanol absolu froid ajouté goutte à goutte sous agitation. Les solutions alcooliques ont été maintenues à -18 °C pendant une nuit puis centrifugées à 15000 g pendant 30 min. Les pastilles ont été dissoutes dans de l'eau distillée chaude. La même procédure a été répétée à nouveau. Les solutions aqueuses finales ont été dialysées contre de l'eau du robinet (48 heures) et de l'eau distillée (20 heures), puis lyophilisées et pesées. Les échantillons ont été testés pour la teneur en glucides, en protéines et en acides nucléiques (Manca et al., 1996). La production des EPS a été testée par la méthode phénol-acide sulfurique sur un bouillon de culture acellulaire en utilisant le glucose

comme étalon (**Dubois et al., 1956**). La fraction polysaccharidique de la souche 4001 a été purifiée par chromatographie sur gel comme indiqué dans **Manca et al., (1996)**. Le rendement des EPS à l'aide de différents glucides dans milieu de croissance le galactose et le saccharose ont provoqué une forte augmentation de la production des EPS pour la souche 4001 (**Nicolaus et al., 2002**).

Le spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'exopolysaccharide a confirmé la présence d'une unité répétitive formée de sept monosaccharides, six de configuration α gluco/galacto et un résidu de conformation β (**Nicolaus et al., 2002**).

12. La production des EPS par la bactérie thermophile *Bacillus licheniformis* (T14)

Spanò et al. (2013) ont isolé une souche haloalcaliphile et thermophile de *Bacillus* (T14) productrice d'EPS d'une source hydrothermale peu profonde de l'île de Panarea (Italie).

Huit sucres différents (glucose, saccharose, tréhalose, fructose, ribose, xylose, mannose et cellobiose) ont été testés comme source de carbone dans 10 mL d'un milieu minimal d'extrait de levure (0,01 %, w/v) dans l'eau de mer (SWY). La culture a été effectuée pendant 3 jours et la croissance a été déterminée en mesurant la densité optique (DO₆₀₀). La production d'EPS a également été étudiée dans un bioréacteur de 1,0 L avec un volume de travail de 0,50 L de SWY plus saccharose (5 %). La croissance a été réalisée à 50 °C pendant 48 h et à une vitesse d'agitation de 300 tr/min. Le pH initial du milieu était de 8 et le débit d'air était fixé à 1 vvm.

Les cellules ont été éliminées par centrifugation (9 800 x g, 20 min à 4 °C). Le surnageant résultant a été traité avec un volume égal d'éthanol froid ajouté goutte à goutte sous agitation dans un bain de glace, et le mélange a été incubé à -20 °C pendant une nuit puis centrifugé à 13 000 x g pendant 30 min. Les culots ont été lavés deux fois avec de l'éthanol et dissous dans de l'eau chaude (80-90°C), dialysés contre de l'eau distillée puis lyophilisés et mesurés. L'EPS lyophilisé (5 mg) a été dissous dans 5 ml d'eau déminéralisée par chauffage à 80 °C pendant environ 15 à 20 minutes et laissé refroidir à température ambiante (28 ± 2 °C) (**Spanò et al., 2013**).

Dans des conditions optimales de croissance (température 50 °C ; pH 8 et NaCl 5 %), la souche T14 a produit le rendement en EPS le plus élevé (366 mg l⁻¹) en fermenteur après

48 h d'incubation, correspondant à la phase stationnaire de croissance, avec 5 % de saccharose comme source de carbone et 0,1 % d'extrait de levure (Spanò *et al.*, 2013).

Après purification de l'EPS, trois fractions ont été obtenues : la fraction EPS1 affichait le rendement le plus élevé (16,1 mg), EPS2 (6,7 mg) et EPS3 (5,3 mg). La fraction EPS1 présentait la teneur en glucides la plus élevée (99 %), tandis que EPS2 et EPS3 affichaient respectivement 31 et 37 %. La teneur en protéines et en acides nucléiques était négligeable pour toutes les fractions d'EPS testées. EPS1 de la souche T14 est un hétéropolymère, affichant le fructose et le fucose comme constituants principaux. En particulier, EPS1 présentait un poids moléculaire élevé (environ 1000 kDa). L'analyse de la composition des monosaccharides a montré la présence de trois résidus neutres composant l'unité répétitive de saccharide. De plus, la RMN a révélé une structure β -manno-pyranoside pour les liaisons anomères du polymère avec la présence probable de groupes acyle comme suggéré par l'analyse FT-IR (Spanò *et al.*, 2013).

Le poids moléculaire de l'EPS a été estimé par filtration sur gel sur Sepharose CL-6B. L'hydrolyse du polysaccharide a été réalisée avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,5 N à 120 ° C pendant 2 h. Les composants de sucre ont été déterminés à la fois au moyen de CCM et par détecteur ampérométrique pulsé par échange d'anions à haute pression (HPAE-PAD)-Dionex (Spanò *et al.*, 2013).

13. La production des EPS par la souche *Bacillus licheniformis* B3-15

Bacillus licheniformis B3-15, une souche marine thermotolérante productrice d'un nouvel exopolysaccharide (EPS-B3-15), a été isolée par Caccamo *et al.* (2020) à 0,7 m d'un échantillon de fluide thermique prélevé dans une cheminée hydrothermale peu profonde située à Porto di Levante (Vulcano, Îles Éoliennes, Italie). La souche B3-15 a été inoculée dans un milieu minimal MD 162 et incubée à 45,0 °C (température de croissance optimale) La plage de pH pour la croissance était de 5,5 à 9,0 avec l'optimum à pH 7. La souche B3-15 a poussé de façon optimale avec 2 % (p/v) de NaCl.

L'EPS produit par cette souche contenait 66 % de glucides, 5 % de protéines et un poids moléculaire de 600 kDa. L'analyse GC-MS des monosaccharides de l'EPS-B3-15 a révélé le mannose et le glucose comme constituants principaux. Le spectre RMN, a montré que l'EPS2-B3-15 possède une unité répétitive tétrasaccharidique, essentiellement

composée de sucres ayant une configuration manno-pyranosidique. Les propriétés thermiques de l'EPS-B3-15 produit par le thermotolérant marin *Bacillus licheniformis* B3-15, ont été caractérisées par spectroscopie ATR-FTIR dans la plage de température allant de la température ambiante à 78,5 °C. L'analyse a révélé que le système EPS B3-15 possède une stabilité élevée jusqu'à 78,5 °C et une conformation moléculaire différente à 45,0 °C (Caccamo et al., 2020).

Conclusion

Conclusion

Les sources chaudes marines, les sources chaudes terrestres et les bassins thermiques en haute mer se sont avérés être des principaux habitats soutenant les organismes microbiens thermophiles, et la plupart des produits EPS par les bacilles thermophiles ont été localisés dans ces types d'environnements. Il a été démontré que plusieurs bactéries thermophiles dans les événements marins chauds peu profonds ou les sources chaudes marines produisent de grandes quantités des EPS (**Manca et al., 1996 ; Nicolaus et al., 2002 ; Moriello et al., 2003**). Les niveaux de production des EPS observés par les producteurs thermophiles étaient inférieurs à ceux rapportés par les producteurs mésophiles, variant généralement entre 50 et 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Kambourova et al. 2009 ; Manca et al., 1996 ; Nicolaus et al., 2003**). Des quantités plus élevées des EPS (366 $\mu\text{g/mL}$) ont été rapportées pour la bactérie thermophile facultative *Bacillus licheniformis* (**Spanò et al., 2013**) pour une culture de 48 h à une température de 50 °C dans un milieu complexe. *Brevibacillus thermoruber* 423 a été signalé comme ayant le rendement le plus élevé (863 $\mu\text{g/mL}$) par rapport aux autres thermophiles. (**Yildiz et al., 2014 ; Rampelotto, 2016**). La culture des thermophiles dans les bioréacteurs se caractérise par certaines caractéristiques. Le besoin d'une bonne aération et agitation est déterminé par la plus faible solubilité de l'oxygène à haute température, bien que le coefficient de transfert d'oxygène augmente (**Rampelotto, 2016**).

Des études sur les exopolysaccharides de bacilles thermophiles ont révélé leurs propriétés intéressantes, telles qu'un poids moléculaire élevé indiquant une bonne viscosité, une stabilité des molécules dans des conditions industrielles difficiles, de bonnes propriétés émulsifiantes et une bonne synergie, activité biologique contre les composés cytotoxiques, activités antivirales et immunomodulatrices suggérant le potentiel des EPS issus de microorganismes thermophiles dans plusieurs procédés biotechnologiques et biomédicaux (**Rampelotto, 2016**), et qu'ils peuvent également minimiser la contamination de l'environnement par la croissance microbienne mésophile, réduire les coûts de maintenance opérationnelle et améliorer l'efficacité de l'utilisation du substrat (**Wang et al., 2019a**).

Des niveaux relativement faibles de synthèse des EPS par des micro-organismes thermophiles et un coût de production plus élevé en conséquence déterminent l'intérêt pour le développement des EPS microbiens utilisés dans des niches de marché à forte valeur, où les propriétés souhaitées ou le degré de pureté ne pouvaient pas être suggérés

par les polymères traditionnels (**Kumar et al., 2007**). Les nouveaux biopolymères produits par des bacilles thermophiles pourraient suggérer une structure chimique différente et, par conséquent, des propriétés physicochimiques différentes utiles pour des applications médicales et pharmaceutiques, en particulier pour l'administration de médicaments, l'ingénierie tissulaire, en tant qu'agents immunostimulateurs, immunomodulateurs, antitumoraux, antiviraux, anti-inflammatoires et antioxydants (**Arena et al., 2009 ; Lee et Mooney, 2012 ; Freitas et al., 2014**).

Comme de nombreux processus de production alimentaire fonctionnent à des températures élevées, la thermostabilité des exopolysaccharides synthétisés par les bacilles thermophiles est une caractéristique importante pour leurs applications industrielles (**Sajna et al., 2013**). La température élevée de destruction de ces EPS indique une préparation facile des émulsions pour différents produits alimentaires et des crèmes cosmétiques à température plus élevée où la viscosité est plus faible et le mélange est plus facile. C'est aussi une préposition pour la conservation à long terme des produits reçus même à température ambiante. Les solutions des EPS thermostables sont capables de maintenir une viscosité élevée à haute température des fluides de forage pétrolier. Ils pourraient avoir un grand potentiel en tant qu'agents flocculants dans les processus thermophiles du traitement municipal et des eaux usées (**Rampelotto, 2016**).

Les bacilles thermophiles peuvent avoir une valeur commerciale dans la synthèse de composés importants et intéressants de plus en plus de nombreux secteurs de l'industrie (**Wang et al., 2019a**). Il existe déjà des preuves significatives que les EPS des thermophiles ont un large éventail de propriétés intéressantes pour les applications industrielles (**Nicolaus et al., 2004**).

Cette revue de littérature a permis de mettre en exergue l'importance et l'intérêt de ces biomolécules dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire cosmétique et également le peu de travaux nationaux publiés à part ceux de **Boukelata et al. (2018)** ce qui souligne la pertinence d'exploiter cet axe de recherche au niveau national

Résumé

Les *Bacillus* thermophiles ont la capacité de produire différents types d'exopolysaccharides (EPS) présentant une grande diversité de structures. Ces exopolysaccharides peuvent être de nature homopolysaccharide ou hétéropolysaccharide. Les EPS de *Bacillus* thermophiles ont largement attiré l'attention en raison de leurs avantages tels qu'un temps de fermentation court, une diminution de la viscosité du polymère synthétisé et de la culture correspondante et de la nature non toxique du polymère permettant des applications dans les domaines alimentaire et pharmaceutique. Le glucose et le saccharose sont les sources de carbone les plus couramment utilisées pour la production d'EPS. Des grandes valeurs de productivité ont été signalées pour la production d'EPS par les souches de *Bacillus* thermophiles tels que *Geobacillus sp.* WSUCF, il a été démontré que la production des EPS par cette souche donne un rendement allant jusqu'à 526 mg/L à ($T^{\circ}= 60^{\circ}\text{C}$, pH 7,0 ; glucose, 6,0 g/L ; de l'extrait de levure, 1,0 g/L et du NaCl, 3,0 g/L).

Mots clés : *Bacillus* thermophiles, Exopolysaccharides, les techniques de production

Abstract

The thermophilic *Bacillus* have the ability to produce different types of exopolysaccharides (EPS) with a wide diversity of structures. These exopolysaccharides can be homopolysaccharide or heteropolysaccharide. The thermophilic *Bacillus* EPS have greatly drawn attention due to their advantages such as short fermentation time, a decrease in the viscosity of the synthesized polymer and the corresponding culture and the non -toxic nature of the polymer allowing applications in the food and pharmaceutical fields. Glucose and sucrose are the most commonly used carbon sources for EPS production. High productivity values have been reported for EPS production by thermophilic *Bacillus* strains such as *Geobacillus sp.* WSUCF, EPS production by this strain has been shown to yield up to 526 mg/L at ($T^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$, pH 7.0, glucose, 6.0 g/L, of the 'yeast extract, 1.0 g/L and NaCl, 3.0 g/L).

Keywords : Thermophilic *Bacillus*, Exopolysaccharides, production technics.

ملخص

Bacillus المحبة للحرارة لديها القدرة على إنتاج أنواع مختلفة من عديدات السكاريد الخارجية (EPS) مع مجموعة متنوعة من الهياكل. يمكن أن تكون عديدات السكاريد الخارجية متجانسة أو غير متجانسة. حظيت (EPS) المنتجة من طرف *Bacillus* المحبة للحرارة باهتمام واسع نظرا لمزاياها مثل وقت التخمير القصير و انخفاض لزوجة البوليمير المركب و الطبيعية غير السامة للبوليمير التي تسمح بالتطبيقات في المجالات الغذائية و الصيدلانية . الجلوكوز و السكروز هما اكثر مصادر الكربون استخداما لإنتاج (EPS) . تم الإبلاغ عن قيم إنتاجية عالية لإنتاج (EPS) بواسطة سلالات *Bacillus* المحبة للحرارة مثل *Geobacillus sp.* WSUCF. لقد ثبت أن إنتاج (EPS) بهذه السلالة ينتج عنه ما يصل الى 526 ملغ/ل عند ($T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$ ، pH=7، الجلوكوز 6,0 غ/ل، مستخلص الخميرة 1,0 غ/ل و NaCl 3,0 غ/ل).

الكلمات المفتاحية : *Bacillus* المحبة للحرارة، السكريات الخارجية، تقنيات الإنتاج.

Références

bibliographiques

1. Abid, Y., & Azabou, S. (2022). Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 415.
2. Abinaya, M., Vaseeharan, B., Divya, M., Vijayakumar, S., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., ... & Benelli, G. (2018). Structural characterization of *Bacillus licheniformis* Dahb1 exopolysaccharide—antimicrobial potential and larvicidal activity on malaria and Zika virus mosquito vectors. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18604-18619.
3. Aguilera, J. M., Lillford, P. J., & Watzke, H. (2008). Why food materials science?. In *Food Materials Science* (pp. 3-10). Springer, New York, NY.
4. Akan, G., & Oner, E. T. (2022). Gel Properties of Microbial Polysaccharides 26. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 579.
5. Alain K., Geslin C., Godfroy A., Prieur D. (2010). Les thermophiles [en ligne] https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles
6. Almatawah, Q. A. (1999). *An inducible nitrilase from a thermophilic Bacillus*. University of London, University College London (United Kingdom).
7. Antón, J., Meseguer, I., & Rodriguez-Valera, F. (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), 2381-2386.
8. Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., & Maugeri, T. L. (2009). An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology letters*, 123(2), 132-137.
9. Arena, A., Maugeri, T. L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., & Bisignano, G. (2006). Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *International Immunopharmacology*, 6(1), 8-13.

10. Arora, A., Sharma, P., & Katti, D. S. (2015). Pullulan-based composite scaffolds for bone tissue engineering: Improved osteoconductivity by pore wall mineralization. *Carbohydrate polymers*, *123*, 180-189.
11. Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *3*, 200.
12. Azeredo, J., Oliveira, R., & Lazarova, V. (1998). A new method for extraction of exopolymers from activated sludges. *Water Science and Technology*, *37*(4-5), 367-370.
13. Badel, S., Bernardi, T., & Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, *29*(1), 54-66.
14. Bajaj, I. B., Survase, S. A., Saudagar, P. S., & Singhal, R. S. (2007). Gellan gum: fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology*, *45*(4), 341-354.
15. Banerjee, A., & Bandopadhyay, R. (2016). Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*, *87*, 295-301.
16. Bérard, A., Clavel, T., Le Bourvellec, C., Davoine, A., Le Gall, S., Doussan, C., & Bureau, S. (2020). Exopolysaccharides in the rhizosphere: a comparative study of extraction methods. Application to their quantification in mediterranean soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *149*, 107961.
17. Bergmaier, D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de LB. *Rhamnosus RW-9595M* d'un milieu à base de perméat de lactosérum.
18. Bhaskar, P. V., & Bhosle, N. B. (2006). Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environment international*, *32*(2), 191-198.

19. Bosma, E. F. (2015). *Isolation, characterization and engineering of Bacillus smithii: a novel thermophilic platform organism for green chemical production* (Doctoral dissertation, Wageningen University and Research).
20. Boukhelata, N., Taguett, F., & Kaci, Y. (2019). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a Saharan bacterium *Paenibacillus tarimensis* REG 0201M. *Annals of Microbiology*, 69(2), 93-106.
21. Bousseboua H. (2005). *Eléments de microbiologie*. 2ème édition. Edition campus club Constantine (Algérie).
22. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
23. Brian-Jaisson, F. (2014). *Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines* (Doctoral dissertation, Toulon).
24. Brown M.J. and Lester J.N.(1980). Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl Environ Microbiol*, 40:107–85.
25. Bruneton J; 1999. *Pharmacognosie (Phytochimie, Plantes médicinales)* 3e Ed:Tec et Doc, Paris, 34-102.
26. Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology*, 144(2), 215-225.
27. Caccamo, M. T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., & Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International journal of biological macromolecules*, 145, 77-83.
28. Caggianiello, G., Kleerebezem, M., & Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(9), 3877-3886.

29. Cameron, E. J., & Esty, J. R. (1926). The Examination of Spoiled Canned Foods: 2. Classification of Flat Sour Spoilage Organisms from Nonacid Foods. *The Journal of Infectious Diseases*, 89-105.
30. Campbell Jr, L. L., & Williams, O. B. (1953). The effect of temperature on the nutritional requirements of facultative and obligate thermophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 65(2), 141-145.
31. Canganella, F. (2012). Ecology and biotechnology of extremophilic microorganisms, particularly anaerobic thermophiles. *Extremophiles: sustainable resources and biotechnological implications*, 175
32. Cartee, R. T., W. T. Forsee & J. Yother (2005) Initiation and synthesis of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 capsule on a phosphatidylglycerol membrane anchor. *Journal of bacteriology*, 187, 4470-4479.
33. Cartee, R. T., W. T. Forsee, J. W. Jensen & J. Yother (2001) Expression of the *Streptococcus pneumoniae* type 3 synthase in *Escherichia coli*. Assembly of type 3 polysaccharide on a lipid primer. *J Biol Chem*, 276, 48831-9.
34. Castonguay, H. (2005). *Étude des microorganismes aérobies thermophiles isolés d'un bioréacteur traitant le lisier de porc* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
35. Cerning J. (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 87 (1): 113-130.
36. Cerning J., Renard C.M.G.C., Thibault J.F., Bouillanne C., Landon M., Desmazeaud M. & Topisirovic L. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied in Environmental Microbiology*. 60: 3914-3919.
37. Chan, C., Burrows, L. L., & Deber, C. M. (2004). Helix induction in antimicrobial peptides by alginate in biofilms. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38749-38754.

38. Characklis W.G., McFeters G.A. et Marshall K.C. (1989). Biofilms. Characklis W.G., Marshall K.C. (eds.), Wiley-Interscience Publication. pp: 195, 341.
39. Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technology & Biotechnology*, 47(2).
40. Chen, X., Siu, K. C., Cheung, Y. C., & Wu, J. Y. (2014). Structure and properties of a (1→3)- β -d-glucan from ultrasound-degraded exopolysaccharides of a medicinal fungus. *Carbohydrate polymers*, 106, 270-275
41. Chien, C. Y., Enomoto-Rogers, Y., Takemura, A., & Iwata, T. (2017). Synthesis and characterization of regioselectively substituted curdlan hetero esters via an unexpected acyl migration. *Carbohydrate polymers*, 155, 440-447.
42. Choi, J. W., Choi, H. G., & Lee, W. H. (1996). Effects of ethanol and phosphate on emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. *Journal of biotechnology*, 45(3), 217-225.
43. Comte, S., Guibaud, G., & Baudu, M. (2006). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1–2), 237–245.
44. Costerton J.W. et Irwin R.T., (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 299-324.
45. Crabb, J. W., Murdock, A. L., & Amelunxen, R. E. (1975). A proposed mechanism of thermophily in facultative thermophiles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 62(3), 627-633.
46. Cruz-Aldaco, K., Govea-Salas, M., Gomes-Araujo, R., Dávila-Medina, M. D., & Loredó-Trevino, A. (2022). Bioactivities of Bacterial Polysaccharides 23. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 505.
47. D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebusch, E., Lens, P., & Guibaud, G. (2010). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular

sludges: Comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(5), 1589–1599.

48. Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental microbiology reports*, 5(6), 778-786.
49. Délattre C., (2005). Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de gluconate, pdf, 4-11.
50. Deng, P., Zhang, G., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Fan, K., ... & Zhang, J. (2011). Extraction and in vitro antioxidant activity of intracellular polysaccharide by *Pholiota adiposa* SX-02. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(1), 50-54.
51. Dhaneshwar, S., Bhilare, N., & Roy, S. (2022). Dextran Pharmaceutical Applications 31. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 695.
52. Dignac M.F., Urbain V., Rybacki D., Bruchet A., Snidaro D., Scribe P. (1998). Chemical description of extracellular polymeric substances: implication on activated sludge floc structure. *Water Sci Technol*, 38(8–9):45–53.
53. Dimopoulou, M. (2013). *Les polysaccharides de la bactérie lactique Oenococcus oeni, de l'élucidation de leurs structures et voies de biosynthèse à leur valorisation technologique* (Doctoral dissertation, Bordeaux 2).
54. Domínguez, L., Rodríguez, M., & Prats, D. (2010a). Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges: Part II: Influence of extraction methods over molecular weight distribution. *Desalination*, 262(1–3), 106– 109.
55. Domínguez, L., Rodríguez, M., & Prats, D.(2010b). Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part I: Influence of extraction methods over three-dimensional EEM fluorescence spectroscopy fingerprint. *Desalination*, 261(1–2), 19–26.
56. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.

57. Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
58. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
59. Duru, Ö. A. (2019). Microbial Exopolysaccharides.
60. Erden, G., Demir, O., & Filibeli, A. (2010). Disintegration of biological sludge: Effect of ozone oxidation and ultrasonic treatment on aerobic digestibility. *Bioresource Technology*, 101(21), 8093–8098.
61. Erkorkmaz, B. A., Kırıtıl, O., Ateş Duru, Ö., & Toksoy Öner, E. (2018). Development of a cost-effective production process for *Halomonas* levan. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(9), 1247-1259.
62. Fang, H. H., & Jia, X. S. (1996). Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludges. *Biotechnology techniques*, 10(11), 803-808.
63. Fang, L., & Catchmark, J. M. (2015). Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. *Carbohydrate polymers*, 115, 663-669.
64. Fernandes, J., Deo, D., & Kulkarni, R. (2021). Molecular Engineering of Bacterial Exopolysaccharide for Improved Properties. In *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials* (pp. 85-103). Springer, Cham.
65. Finore, I., Di Donato, P., Mastascusa, V., Nicolaus, B., & Poli, A. (2014). Fermentation technologies for the optimization of marine microbial exopolysaccharide production. *Marine drugs*, 12(5), 3005-3024.
66. Flemming, H.C. and Wingender, J.(2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev.Microbiol.*8, 623–633.

67. Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of applied microbiology*, 90(2), 151-157.
68. Forster C.F. & Clarke A.R. (1983). The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment plant operation. *Water Pollut Control*, 82:430-3.
69. Forterre, P., Gribaldo, S., Gabelle, D., & Serre, M. C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, 89(4), 427-446.
70. Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 29(8), 388-398.
71. Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A., Crespo, J. G., & Coelho, I. M. (2014). Microbial polysaccharide-based membranes: current and future applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(6).
72. Freitas, F., Torres, C. A., & Reis, M. A. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource technology*, 245, 1674-1683.
73. Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., & Nielsen, P. H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water research*, 30(8), 1749-1758.
74. Fujita M. & Kanehisa M. (2005). Comparative analysis of DNA binding proteins between thermophilic and mesophilic bacteria. *Genome informatics* 16: 174-181.
75. García Becerra, F. Y., Acosta, E. J., & Allen, D. G. (2010). Alkaline extraction of wastewater activated sludge biosolids. *Bioresource Technology*, 101(18), 6972-6980.
76. Garcia, J. L., Bensoussan, M., Bianchi, A., & Mandel, M. (1982). Taxonomie numérique de *Bacillus* thermophiles isolés de sols de rizière de l'Afrique de l'Ouest. *Annales de Microbiologie de l'Institut Pasteur (Paris) A*, 133, 471-488
77. Geesey G.G. (1982). Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. *American Society for Microbiology news*. 48 (1): 9-14.

78. Giavasis, I. (2013). Production of microbial polysaccharides for use in food. In *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals* (pp. 413-468). Woodhead Publishing.
79. Greenfield, L. K., & Whitfield, C. (2012). Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways. *Carbohydrate research*, 356, 12-24.
80. Guezennec, J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: a new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest?. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 204-208.
81. Guezennec, J. (2012). Exopolysaccharides pour la prévention et la lutte contre la formation de biofilms. EP 2 402 403 A1.
82. Guezennec, J. (2016). Bacterial exopolysaccharides from unusual environments and their applications. *The Perfect Slime: Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS)*, 135.
83. Gugliandolo, C., Lentini, V., Spanò, A., & Maugeri, T. L. (2012). New bacilli from shallow hydrothermal vents of Panarea Island (Italy) and their biotechnological potential. *Journal of applied microbiology*, 112(6), 1102-1112.
84. Haki G.D. & Rakshit S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes. *Bioresour. Technol.* 89: 17-34.
85. Hamed, S.B. & Belhadri, M. (2009) Rheological properties of biopolymers drilling fluids. *J. Petrol. Sci. Eng.* 67, 84-90.
86. Hassan, A. N. (2008). ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and challenges of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 91(4), 1282-1298.
87. Hidalgo-Cantabrana, C., López, P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Suárez, A., Margolles, A., & Ruas-Madiedo, P. (2012). Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(4), 227-237.

88. Hongpattarakere, T., Cherntong, N., Wichienchot, S., Kolida, S., & Rastall, R. A. (2012). In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 846-852.
89. Hubbard, C., J. T. McNamara, C. Azumaya, M. S. Patel & J. Zimmer. (2012). The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J Mol Biol*, 418, 21-31.
90. Huber, R., Huber, H., & Stetter, K. O. (2000). Towards the ecology of hyperthermophiles: biotopes, new isolation strategies and novel metabolic properties. *FEMS microbiology reviews*, 24(5), 615-623.
91. Huber, R., Langworthy, T. A., König, H., Thomm, M., Woese, C. R., Sleytr, U. B., & Stetter, K. O. (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 C. *Archives of Microbiology*, 144(4), 324-333.
92. Hug, I., & Feldman, M. F. (2011). Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology*, 21(2), 138-151.
93. Hutkins. R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell Publishing. Premiere edition.
94. Islam, S. T., & Lam, J. S. (2013). Wzx flippase-mediated membrane translocation of sugar polymer precursors in bacteria. *Environmental microbiology*, 15(4), 1001-1015.
95. Islam, S. T., & Lam, J. S. (2014). Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian journal of microbiology*, 60(11), 697-716.
96. Jahn, A., & Nielsen, P. H. (1995). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Science and Technology*, 32(8), 157-164.
97. Jenny Angel, S., Vidyadharani, G., Santhosh, S., & Dhandapani, R. (2018). Optimization and characterisation of thermo stable exopolysaccharide produced from

Bacillus licheniformis WSF-1 strain. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3824-3833.

98. Jolly L., Vincent S.J.F., Duboc P. et Neeser J.R. (2002). Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82 (1-4): 367-374.
99. Jorand, F., Zartarian, F., Thomas, F., Block, J. C., Bottero, J. Y., Villemin, G., ... & Manem, J. (1995). Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water research*, 29(7), 1639-1647.
100. Kamat, S. (2021). Molecular Basis and Genetic Regulation of EPS. In *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials* (pp. 45-83). Springer, Cham.
101. Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., & Tommonaro, G. (2009). Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 338-343.
102. Kambourova, M., Radchenkova, N., Tomova, I., & Bojadjieva, I. (2016). Thermophiles as a promising source of exopolysaccharides with interesting properties. In *Biotechnology of Extremophiles*: (pp. 117-139). Springer, Cham.
103. Kanika, S., & Hema, C. (2016). Exopolysaccharide (EPS)-producing bacteria: an ideal source of biopolymers. *The handbook of microbial bioresources*, 441-455.
104. Kanlayavattanakul, M., & Lourith, N. (2022). Natural Polysaccharides for Skin Care 35. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 823.
105. Kazy, S. K., Sar, P., & D'Souza, S. F. (2008). Studies on uranium removal by the extracellular polysaccharide of a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Bioremediation Journal*, 12(2), 47-57.
106. Kirmizibekmez A. M., Yildiz Y. S., Duru O. A. (2019). Microbial Exopolysaccharides Based Drug Delivery Systems. *Microbial Exopolysaccharides : Current Research and Developments*. PP: 99.

107. Knirel, Y. A., & Kenyon, J. J. (2022). Biosynthesis of Bacterial Polysaccharides 21. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 453.
108. Kothari, D., Das, D., Patel, S., & Goyal, A. (2014). Dextran and food application. *Polysaccharides*. Springer.
109. Kumar A.S., Mody K. & Jha B. (2007) Bacterial exopolysaccharides: A perception. *J Basic Microbiol* 47:103–117.
110. Kumar, M. A., Anandapandian, K. T. K., & Parthiban, K. (2011). Production and characterization of exopolysaccharides (EPS) from biofilm forming marine bacterium. *Brazilian archives of biology and technology*, 54, 259-265.
111. Lee, K.Y. et Mooney, D.J. (2012). Alginate : propriétés et applications biomédicales. *Progrès de la science des polymères*, 37 (1), 106-126.
112. Lehninger, A. (1982). Principes de Biochimie. In David L. & Nelson (Eds.). United States of America: Worth Publishers.
113. Li X.Y. and Yang S.F.(2007). Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Res*, 41:1022–30.
114. Li, R. H., Zeng, T., Wu, M., Zhang, H. B., & Hu, X. Q. (2017). Effects of esterification on the structural, physicochemical, and flocculation properties of dextran. *Carbohydrate Polymers*, 174, 1129-1137.
115. Liang, C., Hu, X., Ni, Y., Wu, J., Chen, F., & Liao, X. (2006). Effect of hydrocolloids on pulp sediment, white sediment, turbidity and viscosity of reconstituted carrot juice. *Food hydrocolloids*, 20(8), 1190-1197.
116. Lin, Y. M., Wang, L., Chi, Z. M., & Liu, X. Y. (2008). Bacterial alginate role in aerobic granular bio-particles formation and settleability improvement. *Separation Science and Technology*, 43(7), 1642-1652.
117. Linker, A., & Jones, R. S. (1966). A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from pseudomonads. *J. biol. Chem*, 241(16), 3845-3851.

- 118.Liu, H., & Fang, H. H. (2002). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of biotechnology*, 95(3), 249-256.
- 119.Logan, N. A. (2009). *Bacillus*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer.
- 120.Logan, Niall A. (2014). "The Genus *Geobacillus*." *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg. 133-147.
- 121.Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of bacteriology*, 188(23), 8213-8221.
- 122.Madhuri, K. V., & Prabhakar, K. V. (2014). Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Oriental journal of chemistry*, 30(3), 1401.
- 123.Madigan, M. et Martinko, J. (2007). Brock Biologie des microorganismes. 11ème édition, *Pearson Education*, 1047p.
- 124.Manca, M. C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A., & Nicolaus, B. (1996). Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillusthermoantarcticus*. *Applied and environmental microbiology*, 62(9), 3265-3269.
- 125.Maouchi, S., & Medjedoub, D. (2020). *Etude bibliographique portant sur les environnements chauds: les microorganismes thermophiles et leurs applications* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- 126.Marteinsson, V., Birrien, J. L., Jeanthon, C., & Prieur, D. (1996). Numerical taxonomic study of thermophilic *Bacillus* isolated from three geographically separated deep-sea hydrothermal vents. *FEMS Microbiology Ecology*, 21(4), 255-266.

127. Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Panico, A., Lama, L., Gambacorta, A., & Nicolaus, B. (2002). A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnology Letters*, 24(7), 515-519.
128. May T.B. and Chakrabarty A.M. (1994). Isolation and assay of *Pseudomonas aeruginosa* alginate. In: Clark V.L., Bavoil P.M., editors. *Methods in Enzymology*, vol. 235. Academic Press, San Diego, Calif. p. 295–304.
129. Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., & Flemming, H. C. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International journal of biological macromolecules*, 26(1), 3-16.
130. Meng, F., Zhou, B., Lin, R., Jia, L., Liu, X., Deng, P., et al. (2010). Extraction optimization and in vivo antioxidant activities of exopolysaccharide by *Morchella esculenta* SO-01. *Bioresource Technology*, 101(12), 4564–4569.
131. Mohite, B. V., Koli, S. H., Narkhede, C. P., Patil, S. N., & Patil, S. V. (2017). Prospective of microbial exopolysaccharide for heavy metal exclusion. *Applied biochemistry and biotechnology*, 183(2), 582-600.
132. Molina I.J., Ruiz-Ruiz C., Quesada E. & Bejar V., (2012). Biomedical Applications of Exopolysaccharides Produced by Microorganisms Isolated from Extreme Environments. *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications*, pp. 357-366.
133. More, V. S., Ebinesar, A., Prakruthi, A., Praveen, P., Fasim, A., Rao, A., ... & More, S. (2021). Isolation and purification of microbial exopolysaccharides and their industrial application. In *Microbial Polymers* (pp. 69-86). Springer, Singapore.
134. Moriello, S.V., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Gambacorta, A., & Nicolaus, B. (2003). Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 95-101.

135. Nanjani, S. G., & Soni, H. P. (2012). Diversity and EPS production potential of halotolerant bacteria from Veraval and Dwarka. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci*, 2(2), 20-25.
136. Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., ... & Ivanov, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenuatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(2), 433-446.
137. Nichols, C. A., Guezennec, J., & Bowman, J. P. (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine biotechnology*, 7(4), 253-271.
138. Nicolaus B, Moriello V, Maugeri T, Gugliandolo C, Gambacorta A (2003) Bacilli from shallow mediterranean marine vents producers of exopolysaccharides. *Recent Res Devel Microbiol* 7:197–208
139. Nicolaus B., Anzelmo G. & Poli A. (2012). Bacterial Polymers Produced by Extremophiles: Biosynthesis, Characterization, and Applications of Exopolysaccharides" dans *Extremophiles : sustainable resources and biotechnological implications*. P. 335
140. Nicolaus, B., Kambourova, M., & Oner, E. T. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145-1158.
141. Nicolaus, B., L. Lama, E. Esposito, M. C. Manca, G. di Prisco, and A. Gambacorta. (1996). *Bacillus thermoantarcticus* sp. nov., from Mount Melbourne, Antarctica: a novel thermophilic species. *Polar Biol*. 16:101–104.
142. Nicolaus, B., Lama, L., Panico, A., Moriello, V. S., Romano, I., & Gambacorta, A. (2002). Production and characterization of exopolysaccharides excreted by

thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of Flegrean Ares (Italy). *Systematic and applied microbiology*, 25(3), 319-325.

143. Nicolaus, B., M. C. Manca, I. Romano, and L. Lama. (1993). Production of an exopolysaccharide from two thermophilic archaea belonging to the genus *Sulfolobus*. *FEMS Microbiol Lett.* 109:203–206.
144. Nicolaus, B., Moriello, V. S., & Maugeri, T. L. (2003). marine vents producers of exopolysaccharides. *Microbiology*, 7, 197-208.
145. Nicolaus, B., Moriello, V. S., Lama, L., Poli, A., & Gambacorta, A. (2004). Polysaccharides from extremophilic microorganisms. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 34(1), 159-169.
146. Nicolaus, B., Panico, A., Manca, M. C., Lama, L., Gambacorta, A., Maugeri, T., ... & Caccamo, D. (2000). A thermophilic *Bacillus* isolated from an Eolian shallow hydrothermal vent able to produce exopolysaccharides. *Systematic and applied microbiology*, 23(3), 426-432.
147. Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14002-14015.
148. Oliveira, J. M., Radhouani, H., & Reis, R. L. (2022). Polysaccharides of Microbial Origin.
149. Öner, E. T., Hernández, L., & Combie, J. (2016). Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology advances*, 34(5), 827-844.
150. Otero, A., & Vincenzini, M. (2003). Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology*, 102(2), 143-152.
151. Padhan, M. (2021). Extremophiles: A Versatile Source of Exopolysaccharide. In *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials* (pp. 105-120). Springer, Cham.

152. Panosyan, H., Di Donato, P., Poli, A., & Nicolaus, B. (2018). Production and characterization of exopolysaccharides by *Geobacillus thermodenitrificans* ArzA-6 and *Geobacillus toebii* ArzA-8 strains isolated from an Armenian geothermal spring. *Extremophiles*, 22(5), 725-737.
153. Park, S. W., Choi, B. S., & Lee, J. W. (2008). Chemical absorption of carbon dioxide into aqueous elastic xanthan gum solution containing NaOH. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(3), 303-307.
154. Patel, A., & Prajapat, J. B. (2013). Food and health applications of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Advances in Dairy Research*, 1-8.
155. Paulo, E. M., Boffo, E. F., Branco, A., Valente, Â. M., Melo, I. S., Ferreira, A. G., ... & Assis, S. A. D. (2012). Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 84, 495-508.
156. Perry J.J., Staily J.T., et Lory S. (2004). Microbiologie. Dunod. (Paris).
157. Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), 1779-1802.
158. Poli, A., Di Donato, P., Finore, I., Leone, L., Nicolaus, B. (2019). Sources, Biosynthesis, Properties, Structures and Applications of Halophilic Exopolysaccharides. *Microbial Exopolysaccharides : Current Research and Developments*, 25
159. Postec, A. (2005). *Diversite de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique profonde: cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles* (Doctoral dissertation, Provence, Aix Marseille I).
160. Prescott C. M., Harley J.P. et Klein D. (2003). Microbiologie. 2ème édition. Deboeck (Paris).

161. Quarmby J, Forster CF.(1995). An examination of the structure of UASB granules. *Water Res*, 11:2449–54.
162. Radchenkova, N., Tomova, A., & Kambourova, M. (2011). Biosynthesis of an exopolysaccharide produced by *Brevibacillus thermoruber* 438. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(sup1), 77-79.
163. Rampelotto, P. H. (2016). *Biotechnology of extremophiles*. Springer International Publishing.
164. Rana, S., & Upadhyay, L. S. B. (2020). Microbial exopolysaccharides: Synthesis pathways, types and their commercial applications. *International journal of biological macromolecules*, 157, 577-583.
165. Randrianjatovo-Gbalou, I., Girbal-Neuhauser, E., & Marcato-Romain, C. E. (2016). Quantification of biofilm exopolysaccharides using an in situ assay with periodic acid–Schiff reagent. *Analytical Biochemistry*, 500, 12-14.
166. Rastogi, G., Bhalla, A., Adhikari, A., Bischoff, K. M., Hughes, S. R., Christopher, L. P., & Sani, R. K. (2010). Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource technology*, 101(22), 8798-8806.
167. Rehm, B. H. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592.
168. Rehm, B. H. (Ed.). (2009). *Alginates: biology and applications* (Vol. 13). Springer Science & Business Media.
169. Robyt, J. F., Yoon, S. H., & Mukerjea, R. (2008). Dextranase and the mechanism for dextran biosynthesis. *Carbohydrate research*, 343(18), 3039-3048.
170. Roca, C., Alves, V. D., Freitas, F., & Reis, M. A. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in microbiology*, 6, 288.
171. Roger, O. (2002). *Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens: obtention, caractérisation et relation structure/fonction* (Doctoral dissertation, Paris 13).

172. Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1-2), 45-61.
173. Ruas-Madiedo P and de los Reyes-Gavilán CG. (2005). Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 88 (3): 843-856.
174. Safitri, R., Kusumawardhani, D. P., Annisa, A., Partasmita, R., Asharina, S., & Maskoen, A. M. (2020). Characterization and identification of three thermophilic *Bacillus* strain isolated from Domas Crater, Mt. Tangkuban Perahu, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(8).
175. Sajna, K. V., Sharma, S., & Nadda, A. K. (2021). Microbial Exopolysaccharides: An Introduction. In *Microbial Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials* (pp. 1-18). Springer, Cham.
176. Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Gottumukkala, L. D., Jayamurthy, H., Dhar, K. S., & Pandey, A. (2013). Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 84-89.
177. Sani, A. M., & Mohanty, K. K. (2009). Incorporation of clay nano-particles in aqueous foams. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 340(1-3), 174-181.
178. Sanin SL, Sanin FD and Bryers JD. (2003). Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry* 38 (6): 909-914.
179. Sanlibaba P and Çakmak GA. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology: Open Access* 2 (2): 1000115.
180. Sato T. & Ose Y. (1984). Floc-forming substances extracted from activated sludge with ammonium hydroxide and EDTA solutions. *Water Sci Technol*, 17(4-5): 517-28.
181. Schembri, M.A.; Dalsgaard, D.; Klemm, P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J. Bacteriol.*, 186, 1249-1257.

182. Schiano Moriello, V., Lama, L., Poli, A., Gugliandolo, C., Maugeri, T. L., Gambacorta, A., & Nicolaus, B. (2003). Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 95-101.
183. Schmid J. (2019). Engineering of Microbial Polysaccharide Structures. *Microbial Exopolysaccharides : Current Research and Developments*. PP:83.
184. Sesay, M. L., Özcengiz, G., & Sanin, F. D. (2006). Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water research*, 40(7), 1359-1366.
185. Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Li, X. Y. (2010). Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: a review. *Biotechnology advances*, 28(6), 882-894.
186. Sheng, G. P., Yu, H. Q., & Yu, Z. (2005). Extraction of the extracellular polymeric substances from a photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas acidophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 125–130.
187. Singleton P. (1994). *Bactériologie*. 2ème edition. Masson (Paris).
188. Sowers, K. R., and R. P. Gunsalus. (1988). Adaptation for growth at various saline concentrations by the archaeobacterium *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* 170:998–1002.
189. Spanò, A., Gugliandolo, C., Lentini, V., Maugeri, T. L., Anzelmo, G., Poli, A., & Nicolaus, B. (2013). A novel EPS-producing strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). *Current microbiology*, 67(1), 21-29.
190. Stetter K.O. (1999) Extremophils and their adaptation to hot environment. *FEMS Lett.* 452: 22-25.
191. Suresh Kumar, A., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of basic microbiology*, 47(2), 103-117.

192. Sürücü, G. (1999). Growth requirements of thermophilic aerobic microorganisms in mixed cultures for the treatment of strong wastes. *Water science and technology*, 40(1), 53-60.
193. Sutherland I.W. (1972). Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 8: 143- 213.
194. Sutherland, I. (2002). A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. *Microbiology today*, 29, 70-71.
195. Sutherland, I. W. (1982). Extracellular and polysaccharides,. In H. J. Rehm and G. Reed (ed.), *Biotechnology*, vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, p. 529–574.
196. Sutherland, I. W. (1990). The properties and potential of microbial exopolysaccharides. *Chim. Oggi* 9:9–14.
197. Sutherland, I. W. (1994). Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology advances*, 12(2), 393-448.
198. Sutherland, I. W. (2001a). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
199. Sutherland, I. W. (2001b). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
200. Umut, E. (2022). Surface Properties of Polysaccharides 24. *Polysaccharides of Microbial Origin*, 527.
201. Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy Öner, E., & Van den Ende, W. (2018). The fructan syndrome: Evolutionary aspects and common themes among plants and microbes. *Plant, Cell & Environment*, 41(1), 16-38.
202. Wang, J., Goh, K. M., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019a). Genome analysis of a thermophilic exopolysaccharide-producing bacterium-*Geobacillus* sp. WSUCF1. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

203. Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2019b). Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate polymers*, *205*, 8-26.
204. Wang, J., Salem, D. R., & Sani, R. K. (2021). Two new exopolysaccharides from a thermophilic bacterium *Geobacillus* sp. WSUCF1: Characterization and bioactivities. *New biotechnology*, *61*, 29-39.
205. Wang, L., Zhang, H., Yang, L., Liang, X., Zhang, F., & Linhardt, R. J. (2017). Structural characterization and bioactivity of exopolysaccharide synthesized by *Geobacillus* sp. TS3-9 isolated from radioactive radon hot spring. *Adv. Biotechnol. Microbiol*, *4*, 1-8.
206. Wang, Z. M., Cheung, Y. C., Leung, P. H., & Wu, J. Y. (2010). Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus. *Bioresource Technology*, *101*(14), 5517-5522.
207. Whitfield, C. & Paiment, A. (2003). Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr Res* *338*, 2491-2502.
208. Whitney, J. C., & Howell, P. L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in microbiology*, *21*(2), 63-72.
209. Yan, Y.-L., Yu, C.-H., Chen, J., Li, X.-X., Wang, W., & Li, S.-Q. (2011). Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. *Carbohydrate Polymers*, *83*(1), 217–224.
210. Yildiz, Y.S., (2019). Exopolysaccharide Production by Thermophilic Microorganisms. *Microbial Exopolysaccharides : Current Research and Developments*, *57*
211. Yildiz, H., & Karatas, N. (2018). Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. *Process Biochemistry*, *72*, 41-46.
212. Yildiz, Y.S., Anzelmo, G., Ozer, T., Radchenkova, N., Genç, S., Di Donato, P., ... & Kambourova, M. (2014). *Brevibacillus themoruber*: a promising microbial cell

factory for exopolysaccharide production. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 314-324.

213. Yuan, T. Q., Xu, F., He, J., & Sun, R. C. (2010). Structural and physico-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasound-assisted extractions of partially delignified fast-growing poplar wood through organic solvent and alkaline solutions. *Biotechnology Advances*, 28(5), 583–593.

214. Zhang, X., Bishop, P. L., & Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water science and technology*, 37(4-5), 345-348.

215. Zhong, K., & Wang, Q. (2010). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 80(1), 19–25.

Site web

[1] (Figure 1 (A)): [En.ligne]

<https://previews.123rf.com/images/sepavo/sepavo1601/sepavo160100086/50256799-beppu-japon-%C3%A0-la-mer-hell-source-d-eau-chaude-ainsi-nomm%C3%A9-pour-son-eau-bleu-.jpg>

[2] Figure 2 (B) : [En.ligne]

https://es.wikipedia.org/wiki/Fuente_hidrotermal

[3] Figure 3 (C) : [En.ligne]

<https://englishosaca.wordpress.com/eightgrade/yellowstones-hot-secret/yellowstone-lake-and-caldera/>

[4] Figure 4 (D): [En.ligne]

<https://www.voyage.fr/boussole-et-sac-dos/les-plus-beaux-geysers-dislande>