

Thèse de Doctorat

Lou LEBELLENGER

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : *Sciences de la Mer et du Littoral*

Discipline : *Microbiologie*

Unité de recherche : *Ifremer, laboratoire Ecosystèmes Microbiens et Molécules Marines pour les
Biotechnologies (EM3B), rue de l'Île d'Yeu – BP21105, 44311 NANTES Cedex 03*

Soutenue le 20 décembre 2017

Etude de la biosynthèse d'un polysaccharide bactérien : vers la production recombinante d'hétéropolysaccharide.

JURY

Président du jury	Dominique Heymann, Professeur, Université de Nantes
Rapporteurs :	Catherine Fontagné-Faucher, Professeur, Université de Toulouse Bernard Priem, Maître de conférences, CERMAV, Grenoble
Examineurs :	Philippe Michaud, Professeur, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand Dominique Heymann, Professeur, Université de Nantes
Directeur de Thèse :	Christine Delbarre-Ladrat, Cadre de recherche, Ifremer, Nantes
Co-directeur de Thèse :	Marguerite Dols-Lafargue, Professeur, ENSCBP, Bordeaux

Table des matières

Liste des abréviations.....	7
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	15
Introduction	18
Première partie : Etude bibliographique.....	20
I. Les polysaccharides et leur importance en glycobiologie	21
A. Définition.....	21
B. Applications biotechnologiques des polysaccharides	22
C. Extraction et production de polysaccharides d'intérêt biotechnologique	26
D. Diversité des polysaccharides de bactéries marines et leurs propriétés	28
E. Mécanisme de biosynthèse des polysaccharides bactériens	30
II. La production de polysaccharides GAG-mimétiques par les bactéries.....	32
A. L'acide hyaluronique produit par <i>Streptococcus</i> sp.	32
B. <i>E. coli</i> K4 et K5	35
III. Les EPS à l'ère de la biologie de synthèse.....	38
A. Modification d'EPS naturels <i>in vitro</i>	38
B. Ingénierie métabolique pour la production d'EPS : K4 et K5	40
C. Production hétérologue	41
D. L'EPS HE800 produit par <i>V. diabolicus</i>	43
E. Stratégies autour du cluster HE800	45
1. Mise en évidence du rôle de SypG dans la régulation du cluster HE800.....	46
a) Rôle du régulateur SypG	46
b) Régulation du cluster de biosynthèse chez <i>V. fischeri</i> et <i>V. vulnificus</i>	46
2. Amélioration de la production de polysaccharides par ingénierie des voies de biosynthèses de leurs précurseurs.....	47
a) Cas de l'acide hyaluronique	47
b) Cas de l'héparosane	51
Deuxième partie : Matériels et Méthodes	54
I. Matériels biologiques	55
A. Souches bactériennes.....	55

B. Vecteurs.....	57
II. Cultures	57
A. Milieux de culture	57
B. Suivi de croissance.....	58
III. Extraction et purification des EPS	59
A. Filtration et ultrafiltration	59
B. Lyophilisation	59
IV. Analyses chimiques et biochimiques	59
A. Analyse de la masse moléculaire.....	59
B. Analyses colorimétriques	60
1. Analyse des oses neutres.....	60
2. Analyse des acides uroniques	60
3. Calcul des pourcentages massiques en oses neutres et oses acides	61
4. Analyse des protéines	61
C. Composition osidique par chromatographie en phase gazeuse (GC)	62
D. Analyses par électrophorèses	63
1. Electrophorèse en gel d'acrylamide (PAGE)	63
2. Electrophorèse en gel d'agarose.....	64
3. Electrophorèse en gel de poly-acrylamide avec dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE).....	64
E. Colorations.....	65
1. Coloration des polysaccharides au Stains-All.....	65
2. Coloration des polysaccharides au réactif de Schiff.	66
3. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.	66
F. Précipitation des polysaccharides	66
V. Biologie moléculaire	67
A. Amorces pour les amplifications	67
B. Extraction et vérification d'acides nucléiques	72
1. Extraction d'ADN génomique total	72
2. Extraction d'ADN plasmidique	72
3. Purification et extraction des produits PCR	72
4. Quantification des acides nucléiques	72
5. Electrophorèse des acides nucléiques	73
6. Séquençages	73
C. Amplifications par PCR	73
1. Amplifications de vérification	73
2. Amplifications haute fidélité pour clonage et séquençage	74

3. Amplification de longs fragments	74
D. RT-qPCR.....	75
1. Dessin des amorces.....	75
2. Échantillonnage	76
3. Extraction des ARN totaux	76
4. Synthèse des ADNc	76
5. PCR quantitative ou qPCR	76
6. Analyse des ARN extraits au Bioanalyzer.....	76
E. Hybridation sur membrane	77
1. Synthèse et marquage des sondes	77
2. Préparation des membranes	77
3. Hybridation et révélation.....	77
F. Constructions génétiques	78
1. Restrictions enzymatiques	78
2. Ligation	79
3. Transformation	79
a) Préparation des cellules compétentes au chlorure de calcium	79
b) Transformation par choc thermique.....	80
G. Transcriptomique	80
1. Cinétique préliminaire	80
2. Extraction des ARN totaux	81
VI. Bioinformatique	81
A. Plateforme Microscope	81
B. Outils pour les dessins d’amorces	81
C. Bases de données	82
D. Analyse des résultats RNA-seq :	82
Troisième partie : Résultats et discussion	85
Chapitre 1 : Diversité du cluster de biosynthèse d’EPS au sein des Vibrionaceae	86
I. Objectifs	86
II. Résultats	87
III. Publication acceptée avec révisions mineures dans la revue BMC Reseach Notes	88
IV. Conclusion	104

Chapitre 2 : Etude du mécanisme de biosynthèse de l'exopolysaccharide HE800 chez <i>Vibrio diabolicus</i> : approche transcriptomique.....	106
I. Choix des conditions de culture	106
A. Choix du milieu et du substrat.	106
B. Choix du moment des prélèvements.	107
II. Traitement des échantillons	109
A. Pureté des ARN	109
B. Qualité des ARN.....	109
III. Analyse transcriptomique.....	109
IV. Profil transcriptomique de <i>V. diabolicus</i> en présence de glucose.	117
A. Effet du glucose sur la transcription des gènes responsables de la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800 chez <i>V. diabolicus</i>	121
B. Etude de l'expression des clusters génétiques liés à la biosynthèse de glyco-polymères	121
C. Le cluster de biosynthèse du HE800.....	124
V. Discussion.....	126
Chapitre 3 : Etude de la production recombinante de l'exopolysaccharide HE800	129
I. Création et criblage de la banque fosmidique d'ADN génomique	129
A. Criblage sur gélose enrichie en glucose	130
B. Criblage par hybridation sur colonie	131
1. Choix des sondes.....	131
2. Préparation des membranes	131
3. Hybridation et révélation.....	132
4. Criblage par PCR.....	132
II. Etude de la production d'EPS par les clones recombinants	133
A. Analyse du milieu extracellulaire de la culture des premiers clones recombinants	133
B. Analyse du contenu extracellulaire et intracellulaire du clone 49	139
C. Vérification des séquences des clusters portés par les clones recombinants.....	142
D. Analyse des contenus intra et extracellulaires des clones 92 et 59 après croissance à différentes températures.....	143
1. Viabilité	143
2. Influence de la température sur la production.....	144
3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits.....	146
a) Analyses par chromatographie en phase gazeuse complémentaires	148

b) Evaluation de l'impact de la dialyse sur l'analyse GC des extraits intracellulaires des clones recombinants 59 et 92.	153
E. Modification du clone 92 : Transformation du clone 92 avec <i>kfid</i> et <i>wbpP</i>	156
F. Expression du cluster HE800.....	159
1. Préparation des amorces	160
2. Expression du cluster chez <i>V. diabolus</i> et chez le clone 92.....	160
3. Recherche de sites de fixation pour les régulateurs de réponse SypG et SmcR sur le cluster HE800	161
4. Construction du mutant 92sypG.....	163
5. Expression du cluster chez <i>V. diabolus</i> , le clone 92, le clone 92sypG et GV723	163
a) Comparaison des niveaux de transcription de <i>sypG</i> chez <i>V. diabolus</i> et le mutant GV723 , mise en évidence d'une régulation de <i>sypG</i>	163
b) Comparaison des niveaux de transcription des gènes placés devant les motifs G chez le clone 92 et le clone 92sypG , mise en évidence de la fixation de SypG.	165
c) Comparaison des niveaux de transcription de <i>sypG</i> chez <i>V. diabolus</i> et chez le clone 92sypG en comparaison avec <i>V. diabolus</i> , mise en évidence d'une différence de régulation.	166
d) Profil de transcription des gènes du cluster HE800 chez <i>V. diabolus</i> et les clones 92sypG et 92.	167
e) Comparaison des niveaux de transcription des gènes <i>sypA</i> , <i>sypI</i> , <i>sypN</i> et <i>sypP</i> chez les clones 92sypG et 92, en fonction du niveau de transcription de <i>sypG</i>	169
f) Mise en évidence de la fixation de SypG sur les motifs précédemment identifiés chez <i>V. diabolus</i>	171
G. Tests de production par le clone 92sypG	171
1. Analyse du surnageant de culture et du contenu intracellulaire du clone 92sypG	172
a) En milieu LB.....	172
b) Test de précipitation des polysaccharides	173
c) En milieu R.....	173
d) Traitements des extraits intracellulaires	175
III. Conclusion	176
Chapitre 4 : Stratégies autour du cluster HE800.	177
I. Etude de la disponibilité en précurseurs sucres chez la souche recombinante	177
II. Assemblage du cluster dans la levure	181
III. Souches recombinantes portant une partie du cluster.....	182
A. Clonage différentiel du cluster HE800.....	183

B. Réassemblage partiel du cluster HE800.	183
Conclusion générale et perspectives.....	186
Productions scientifiques.....	194
Références bibliographiques	196

Liste des abréviations

Acryl/Bis	Rapport de concentration entre l'acrylamide et le bis-acrylamide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AP	Phosphatase alcaline
APS	Persulfate d'ammonium
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCA	Acide bicinchoninique
BCIP/NBT	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro-bleu de tetrazolium
BSA	Albumine de sérum bovin
COG	Classification des protéines par fonction pour les procaryotes (COG pour Cluster of Orthologous Groups)
CPS	Polysaccharide capsulaire
Ct	Valeur seuil en qPCR
DMF	Diméthyl formamide
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EPS	Exopolysaccharide
FDR	Estimation des faux positifs (False Discovery Rate)
GAGs	Glycosaminoglycanes
GAPDH	NAD-dépendante glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GC	Chromatographie en phase gazeuse
GT	Glycosyltransférase
GTE	Glucose/Tris/EDTA
HA	Acide hyaluronique
HPSec	Chromatographie liquide haute performance d'exclusion de taille
K _{LPS}	Forme de K antigène
LB	Milieu de culture (LB pour lysogeny broth)
LB Cm	Milieu LB avec addition de Chloramphénicol
LPS	Lipopolysaccharide
MaGe	Outils de la plateforme MicroScope (MaGe pour Magnifying Genomes)

MALS	Détecteur de la diffusion multi-angle de la lumière (Multi-angle light scattering)
MHDP	3-hydroxydiphényl
NBD	Domaine de liaison aux nucléotides
NTC	Témoin négatif de PCR (No Template Control)
OPX	Protéine d'export des polysaccharides
PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PAS	Acide périodique et réactif de Schiff
PCP	Co-polymérase des polysaccharides
PCR	Amplification par réaction en chaine par la polymérase
PS	Polysaccharide
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
qPCR	PCR en temps réel ou PCR quantitative
qsp	Quantité suffisante pour
RIN	Indice de qualité des ARN (RNA Integrity Number)
RNA-seq	Séquençage des ARN ou séquençage du transcriptome entier
RQ	Quantification relative par RT-qPCR ($RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$)
RT-	Témoin négatif de RT-qPCR (pas d'addition de polymérase)
RT-qPCR	PCR quantitative de l'ARN
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SOC	Milieu de culture
SSC	Solution salée de citrate trisodique
TAE	Tampon Tris/acétate/EDTA
TE	Tampon Tris-EDTA
TEMED	Tetraméthylethylènediamine
TMD	Domaine transmembranaire
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UTP	Uridine 5'-triphosphate

Liste des figures

Figure 1 : Structure, en représentation de Fischer, d'oses à 3, 4, 5 et 6 carbones, d'un acide uronique et d'un ose substitué par un groupe <i>N</i> -Acétyl. Figure extraite de la thèse de V. Boursicot (2012).	21
Figure 2 : Formation d'une liaison <i>O</i> -glycosidique.	22
Figure 3 : Mécanismes potentiels de biosynthèse des polysaccharides chez les bactéries, d'après Cuthbertson (Cuthbertson, Kos, & Whitfield, 2010). TMD : domaine transmembranaire, PCP : co-polymérase polysaccharidique, NBD : domaine de fixation de nucléotides.	32
Figure 4 : Structure de l'acide hyaluronique.	33
Figure 5 : Voie de biosynthèse de l'acide hyaluronique chez <i>Streptococcus zooepidemicus</i> .	34
Figure 6 : Voie métabolique de la synthèse du polysaccharide capsulaire K4 chez <i>E. coli</i> K4.	36
Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'héparosane chez <i>E. coli</i> K5.	37
Figure 8 : Surexpression de l'UDP-glucose déshydrogénase chez <i>E. coli</i> K5.	41
Figure 9 : Structure de l'unité répétitive de l'EPS HE800.	43
Figure 10 : Structure du cluster génétique responsable de la biosynthèse de l'EPS HE800 et protéines codées. La phospho-glycosyltransférase (pGT) greffe le premier monosaccharide sur l'accepteur membranaire lipidique, les glycosyltransférases greffent ensuite les sucres activés (UDP-sucres) sur l'unité répétitive en formation, la polymérisation et l'export sont assurés par Wzx, Wzy et Wza.	44
Figure 11 : Motifs identifiés chez <i>V. fischeri</i> pour la fixation de SypG, d'après Ray <i>et al.</i> (A) (V. A. Ray <i>et al.</i> , 2013). Motifs identifiés chez <i>V. vulnificus</i> , d'après Lee <i>et col.</i> (B) (Lee <i>et al.</i> , 2013).	47
Figure 12 : Production d'acide hyaluronique chez <i>L. lactis</i> d'après Liu <i>et col.</i> (Liu <i>et al.</i> , 2011).	48
Figure 13 : Production d'acide hyaluronique chez <i>L. lactis</i> d'après Prasad <i>et al.</i> (Prasad <i>et al.</i> , 2010).	48
Figure 14 : Production d'acide hyaluronique chez <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , surexpression des gènes responsables de la synthèse d'UDP-acide glucuronique, d'après Chen <i>et al.</i> (Chen <i>et al.</i> , 2009).	49
Figure 15 : Production d'acide hyaluronique chez <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , surexpression des gènes responsables de la synthèse d'UDP- <i>N</i> -Acétylglucosamine, d'après Chen <i>et col.</i> (Chen <i>et al.</i> , 2009).	50

Figure 16 : Production d'acide hyaluronique chez <i>E. coli</i> , d'après Mao <i>et al.</i> (Mao <i>et al.</i> , 2009).....	51
Figure 17 : Production d'héparosane chez <i>E. coli</i> , d'après Roman <i>et col.</i> (Roman <i>et al.</i> , 2003).....	52
Figure 18 : Production d'héparosane chez <i>E. coli</i> , d'après Zhang <i>et col.</i> (Zhang <i>et al.</i> , 2012).....	52
Figure 19 : Courbes de croissance des cultures effectuées en triplicatas pour chaque condition ; en absence de glucose (1-E, 2-E, 3-E) et en présence de glucose (1-G, 2-G, 3-G).....	107
Figure 20 : Production d'EPS par <i>V. diabolicus</i> au bout de 6, 10 et 26 heures de culture en présence de glucose (A), et sans glucose (B). 1, 2 et 3 sont des triplicats. De l'HE800 a été déposé comme témoin positif.	108
Figure 21 : Exemple d'électrophorégramme et de gel synthétique obtenus après séparation d'un extrait d'ARN (correspondant à l'un des 6 échantillons analysés dans cette étude) avec le Bioanalyzer 2100 (Agilent) montrant l'analyse d'un ARN d'excellente qualité avec un RIN (RNA Integrity Number) de 10 (valeur maximale possible).	109
Figure 22 : Classement par grandes fonctions des gènes différentiellement transcrits chez <i>V. diabolicus</i> en présence de glucose.	117
Figure 23 : Niveaux d'expression des gènes composant les clusters HE800 et K _{LPS} en condition « apport en glucose » par rapport à la condition « absence de glucose ».....	125
Figure 24 : Niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 en présence de glucose, corrélés aux promoteurs potentiellement présents sur le cluster HE800, placés par homologie avec le cluster <i>syp</i> de <i>V. fischeri</i>	126
Figure 25 : Clones recombinants repiqués sur gélose LB Cm enrichie en glucose à la teneur de 30 g/L.....	131
Figure 26 : Résultat du criblage par hybridation sur colonie avec la sonde dessinée pour <i>sypC</i> . Le contrôle positif est l'ADN génomique de <i>V. diabolicus</i>	132
Figure 27 : Vérification de la présence des gènes <i>sypC</i> et <i>sypR</i> chez les clones 2, 49, 59, 78 et 92.	133
Figure 28 : Suivi de croissance de la souche <i>E. coli</i> Epi100 et des clones 2, 49, 59, 78 et 92 en milieu LB supplémenté en glucose à la teneur de 30 g/L.....	134
Figure 29 : Suivi de croissance du clone 49 en milieu LB supplémenté en glucose (49G) et en fructose (49F) à la teneur de 30 g/L.....	135
Figure 30 : Composition (pourcentage massique) des lyophilisats des clones 49, 78, 2, 59 et 92 en régime glucose et fructose (Man = mannose, Gal = galactose, Glc = glucose, GlcNAc = <i>N</i> -Acétylglucosamine, GalNAc = <i>N</i> -Acétylgalactosamine, GlcA = acide glucuronique, GalA = acide galacturonique).	138

Figure 31 : Lyophilisat obtenu par croissance de la souche <i>E. coli</i> Epi100 (à partir de 2,5 L de surnageant), en milieu LB fructose à gauche et LB glucose à droite.....	138
Figure 32 : Coloration au réactif de Schiff après séparation par électrophorèse des extraits intracellulaires du clone 49 (cultures, A, B, C et D, Tableau XVII).....	140
Figure 33 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide, suivie d'une coloration au réactif de Schiff des extraits intracellulaires et des surnageants des cultures A, B, C et D du clone 49. Les échantillons qui n'ont pas été concentrés avant dépôt sont indiqués par (nc).	140
Figure 34 : Recoloration au Stains-All du gel précédent (Figure 33).	141
Figure 35 : Coloration au Stains-All des lyophilisats dialysés obtenus à partir des surnageants des cultures C et D. Lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture C (1), lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture D (2), témoin positif HE800 (3).....	142
Figure 36 : Coloration au Stains-All des extraits intracellulaires et surnageants des clones 59 et 92 cultivés à 20°C et 30°C en milieu LB supplémenté en fructose à la teneur de 30 g/L. Surnageant de culture du clone 92 cultivé à 30°C (1), surnageant de culture du clone 92 cultivé à 20°C (2), surnageant de culture du clone 59 cultivé à 30°C (3), surnageant de culture du clone 59 cultivé à 20°C (4), extrait intracellulaire du clone 92 cultivé à 20°C (5), extrait intracellulaire du clone 59 cultivé à 20°C (6), extrait intracellulaire du clone 92 cultivé à 30°C (7), extrait intracellulaire du clone 59 cultivé à 30°C (8), lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture C (9) (Figure 35), lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture D (10) (Figure 25), témoin positif HE800 (11).	145
Figure 37 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des cultures des clones 92 et 59. A : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 59 cultivé à 20°C, B : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 59 cultivé à 30°C, C : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 92 cultivé à 20°C, D : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 92 cultivé à 30°C, E : analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 92 cultivé à 20°C, F : analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 92 cultivé à 30°C, G : analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 59 cultivé à 20°C, H : analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 59 cultivé à 30°C, I : analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'EPS HE800 produit par <i>V. diabolicus</i>	148
Figure 38 : contenus intracellulaires lyophilisés d' <i>E. coli</i> Epi100 à gauche, et du clone 92 à droite, cultivés à 30°C.	149
Figure 39 : Coloration au Stains-All des surnageants de cultures et contenus intracellulaires dialysés du clone 92 et de la souche <i>E. coli</i> Epi100 cultivés à 30 et 20°C. Témoin positif HE800 (1), extrait intracellulaire dialysé de la souche Epi100 cultivée à 20°C (2), surnageant de culture lyophilisé de la souche Epi100 cultivée à 20°C (3), surnageant de culture lyophilisé de la souche Epi100 cultivée à 30°C (4), extrait intracellulaire dialysé de la souche Epi100 cultivée à 30°C (5), extrait intracellulaire	

dialysé du clone 92 cultivé à 30°C (6), surnageant de culture lyophilisé du clone 92 cultivé à 30°C (7). 150

Figure 40 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des cultures du clone 92 et de la souche *E. coli* Epi100. **A :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 20°C, **B :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 30°C, **C :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, **D :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C (ajout GlcA, GalNAc et GlcNAc dans l'échantillon), **E :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 30°C (ajout GlcA, GalNAc et GlcNAc dans l'échantillon). 152

Figure 41 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des cultures des clones 92, 59 et de la souche *E. coli* Epi100. **A :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 30°C, **B :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 30°C, **C :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires lyophilisés du clone 59 cultivé à 30°C, **D :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 59 cultivé à 30°C, **E :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, **F :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, **G :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C (ajout GlcA, GalNAc et GlcNAc à l'échantillon). 155

Figure 42 : Partie du réseau métabolique d'*E. coli* str. K-12 substr. DH10B concernant la synthèse des sucres aminés et activés. (source: site « The SEED Viewer » <http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi>). 157

Figure 43 : Voies de biosynthèse des précurseurs GlcA, GlcNAc et GalNAc de l'EPS HE800 chez *E. coli* str. K-12 substr. DH10B (d'après « The SEED viewer »). 158

Figure 44 : Extraction des plasmides pBBR-*KfiD* et pWKS-*wbpP*. 158

Figure 45 : Rappel de la composition et de l'organisation du cluster de gènes associé à la biosynthèse de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus*, d'après Goudenège (Goudenege et al., 2014). 159

Figure 46 : Niveaux de transcription du cluster HE800 chez le clone 92 par rapport à *Vibrio diabolicus*, au bout de 10 heures de cultures. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 161

Figure 47 : Recherche des séquences consensus pour la fixation de SypG (à gauche) et SmcR (à droite) en aval de *sypP*, *sypN*, *sypH*, et *sypA* sur le cluster HE800. 162

Figure 48 : Niveaux de transcription de *sypG* chez GV723 par rapport à *V. diabolicus* au bout de 5, 10 et 24 heures de culture. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 164

Figure 49 : Profils de transcription de <i>sypG</i> chez <i>V. diabolicus</i> à gauche, et GV723 à droite (La valeur de RQ de 1 a été attribuée au niveau de transcription à 24 heures, afin de pouvoir exprimer ceux relevés à 5 et 10 heures par rapport à cette valeur). $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	164
Figure 50 : Niveaux de transcription des gènes <i>sypA</i> , <i>sypI</i> , <i>sypN</i> et <i>sypP</i> chez le clone 92sypG en comparaison avec le clone 92 (Le niveau de transcription de <i>sypG</i> n'est pas indiqué ; 3500 fois supérieur chez 92 sypG en comparaison avec le clone 92). $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	165
Figure 51 : Profil de transcription de <i>sypG</i> chez <i>V. diabolicus</i> (A)(La valeur de RQ de 1 a été attribuée au niveau de transcription à 24 heures, afin de pouvoir exprimer ceux relevés à 5 et 10 heures par rapport à cette valeur)), et niveaux de transcription de <i>sypG</i> chez le clone 92sypG, en comparaison avec <i>V. diabolicus</i> . $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	166
Figure 52 : Niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 chez <i>V. diabolicus</i> , en comparaison avec le clone 92, au bout de 5, 10 et 14 heures 30 de culture, glucose 60 g/L. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	167
Figure 53 : Niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 chez le clone 92sypG, en comparaison avec le clone 92, au bout de 5, 10 et 14 heures 30 de culture, glucose 60 g/L. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	169
Figure 54 : Niveaux de transcription des gènes <i>sypA</i> , <i>sypI</i> , <i>sypN</i> , <i>sypP</i> et <i>sypR</i> chez le clone 92sypG, en comparaison avec le clone 92, au bout de 10, 11 et 12 heures de cultures. Le niveau de transcription de <i>sypG</i> était respectivement 2490, 6900 et 1110 fois supérieur chez 92sypG, en comparaison avec le clone 92. Glucose 30 g/L. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.	170
Figure 55 : Extraits intracellulaires de la souche <i>E. coli</i> BL21(DE3)-sypG colorés au bleu de Coomassie au bout de 24 heures de culture. Extraits intracellulaires en milieu LB (1), Extraits intracellulaires en milieu LB IPTG 1mM (2), marqueur de taille (3).	171
Figure 56 : Coloration au Stains-All des extraits intracellulaires et extracellulaires du clone 92sypG sur gel d'agarose à gauche, et sur gel de polyacrylamide à droite. Témoin HE800 (1), extrait intracellulaire (2), surnageant de culture (3), surnageant de culture ultrafiltré (4).	172
Figure 57 : Electrophorèse en gel d'agarose et coloration au Stains-All des produits du test de production du clone 92sypG en milieu R. Témoin HE800, surnageant de culture A (2), surnageant de culture B (3), surnageant de culture C (4), surnageant de culture D (5) , extraits intracellulaires de la culture A (6), extraits intracellulaires de la culture B (7), extraits intracellulaires de la culture C (8), extraits intracellulaires de la culture D (9).	174
Figure 58 : : Coloration au SYBR™ safe (A) puis au Stains-All (B) des extraits intracellulaires du clone 92sypG en milieu R. Témoin HE800 (1), extraits intracellulaires de la culture A (2), extraits intracellulaires de la culture B (3), extraits intracellulaires de la culture C (4), extraits intracellulaires de la culture D (5).	174
Figure 59 : Coloration au SYBR™ safe (A) puis au Stains-All (B) des extraits intracellulaires des cultures B et D du clone 92sypG en milieu R, soumis à différents traitements. Extraits intracellulaires de la culture B soumis au traitement 2 (B2), extraits	

intracellulaires de la culture B soumis au traitement 3 (B3), extraits intracellulaires de la culture B soumis au traitement 4 (B4), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 1 (D1), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 2 (D2), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 3 (D3), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 4 (D4).....176

Figure 60 : Voies de biosynthèse des précurseurs de l'EPS HE800 chez *E. coli* DH10B (source The SEED Viewer).....178

Figure 61 : Sélection des enzymes impliquées dans la formation des précurseurs de l'EPS HE800 chez *E. coli* DH10B. Les noms des enzymes sélectionnées sont entourés en vert. ...179

Figure 62 : Etude transcriptionnelle des gènes impliqués dans la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus* au bout de 3, 6 et 9 heures de culture en présence de glucose.....180

Figure 63 : Assemblage du cluster HE800 dans le vecteur navette pRS416.182

Figure 64 : Dessin des fragments choisis pour le clonage différentiel du cluster HE800. Les promoteurs potentiels ont été placés par homologie avec le cluster *syp* (E. S. Yip et al., 2005).....183

Figure 65 : Réassemblages partiels envisagés du cluster HE800.185

Liste des tableaux

Tableau I : Structure de différents glycosaminoglycanes d'après Lamoureux et col. (Lamoureux, Baud'huin, Duplomb, Heymann, & Redini, 2007).	24
Tableau II : Souches bactériennes utilisées	55
Tableau III : Vecteurs utilisés	57
Tableau IV : Amorces utilisées.....	67
Tableau V : Outils Galaxy utilisés dans le déroulement de l'analyse du RNA-seq.....	82
Tableau VI : Exemple de résultats obtenus après traitement des données RNA-Seq par le logiciel GFOLD.....	83
Tableau VII : Ensemble des gènes exprimés au moins 2 fois plus en présence de glucose chez <i>V. diabolicus</i> . La colonne COG comporte des lettres servant à classifier la fonction attribuée à chaque gène (procédé COG). C, E, G, H, I, P et Q correspondent au métabolisme, M, N, O, T, U et V correspondent aux procédés cellulaires et la signalisation, K et L aux stockage et traitement de données, R et S sont peu caractérisés. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.....	110
Tableau VIII : Ensemble des gènes exprimés au moins 2 fois moins en présence de glucose chez <i>V. diabolicus</i> . La colonne COG comporte des lettres servant à classifier la fonction attribuée à chaque gène (procédé COG). C, E, G, H, I, P et Q correspondent au métabolisme, M, N, O, T, U et V correspondent aux procédés cellulaires et la signalisation, K et L aux stockage et traitement de données, R et S sont peu caractérisés. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.....	113
Tableau IX : Ensemble des gènes transcrits au moins 7 fois plus chez <i>V. diabolicus</i> en présence de glucose. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.	118
Tableau X : Ensemble des gènes transcrits au moins 7 fois moins chez <i>V. diabolicus</i> en présence de glucose. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.	119
Tableau XI : Niveaux de transcription des gènes de chez <i>V. diabolicus</i> comme potentiellement associés à la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.	121
Tableau XII : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster HE800 chez <i>V. diabolicus</i> , en présence de glucose. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de	

multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.....	122
Tableau XIII : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster K _{LPS} chez <i>V. diabolicus</i> , en présence de glucose. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.....	123
Tableau XIV : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster lipide A cœur chez <i>V. diabolicus</i> , en présence de glucose. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.....	123
Tableau XV : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster LPS chez <i>V. diabolicus</i> , en présence de glucose. La colonne log ₂ fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.....	124
Tableau XVI : Caractérisation des lyophilisats des clones recombinants par dosage colorimétrique. Les % massiques caractérisent la masse de lyophilisat, la colonne sucre indique quel substrat a été utilisé pour la culture, l'absorbance indiquée est celle relevée en fin de culture (48 heures).....	135
Tableau XVII : Cultures effectuées avec le clone 49.	139
Tableau XVIII : Mutations observées sur les clusters des clones recombinants.	143
Tableau XIX : Absorbance des cultures des clones 92 et 59 à 20°C et 30°C au bout de 48 heures de culture.....	144
Tableau XX : Absorbance des cultures de la souche <i>E. coli</i> Epi100 à 20°C et 30°C, et du clone 92 à 30°C, au bout de 48 heures de culture.	148
Tableau XXI : Echantillons analysés par chromatographie en phase gazeuse.	150
Tableau XXII : Echantillons analysés par chromatographie en phase gazeuse.	153
Tableau XXIII : Composition des milieux de cultures testés pour l'effet de la supplémentation en sucres composant le HE800 notamment, sur la production d'un EPS par le clone 92sypG.....	173
Tableau XXIV : Récapitulatif des traitements effectués sur 50 µL de chaque échantillon.	175

« L'important n'est pas ce qu'on fait de nous, mais ce que nous faisons nous-mêmes
de ce que l'on fait de nous. »

Jean-Paul Sartre

Introduction

Les polysaccharides sont les macromolécules les plus abondantes de la biosphère. Ils peuvent être produits par des plantes supérieures, champignons, algues, animaux, levures et bactéries. Ils sont utilisés dans divers domaines industriels, tels l'agroalimentaire, la protection de l'environnement, la cosmétique et la santé. Ces industries exploitent leurs propriétés fonctionnelles (certains peuvent servir d'agent de texture ou d'agent chélatant), et leurs propriétés biologiques (ils peuvent être utilisés comme agents de régénération tissulaire, anticoagulants ou encore antitumoraux).

En industrie, les polysaccharides sont principalement extraits de matières premières végétales ou animales, ou produits par des bactéries. Cette dernière source présente de nombreux avantages. La production de polysaccharides bactériens permet, en effet, de s'affranchir de la disponibilité et de l'état physiologique d'organismes animaux ou végétaux, des risques de contaminations virales, de lourdes étapes d'extractions, par le biais d'une production biorenouvelable.

Les océans recouvrent plus de 70 % de la surface terrestre. Ils rassemblent une grande variété d'écosystèmes, dont font partie les sources hydrothermales. Les systèmes hydrothermaux profonds sont caractérisés par des gradients de pression et de température importants, mais aussi par la présence de composés toxiques. Les bactéries qui colonisent ces environnements singuliers sont susceptibles de produire de nouvelles molécules d'intérêt.

La bactérie marine *Vibrio diabolicus*, a été isolée d'un échantillon collecté près d'une source hydrothermale océanique profonde, au cours de la campagne océanographique HERO menée en 1991 par l'Ifremer sur la rive du Pacifique Oriental. Cette bactérie synthétise un exopolysaccharide (EPS) de type glycosaminoglycane (GAG) nommé HE800, et dont la structure est proche de celle de l'acide hyaluronique. Le HE800, sous sa forme native, a déjà montré des propriétés cicatrisantes lorsque utilisé comme implant de comblement osseux ; il est actuellement étudié pour des applications en cosmétique ou en santé humaine, en tant que glycosaminoglycane-mimétique.

L'objectif de ce travail de thèse est d'approfondir la connaissance des mécanismes de biosynthèse de l'EPS HE800 par *V. diabolicus*. Les mécanismes de biosynthèse des polysaccharides et leurs régulations déterminent, en effet, la structure chimique du polymère.

Or, les propriétés biologiques des polysaccharides reposent sur leur structure chimique qui se définit par la composition osidique, la présence de substituants, la nature des liaisons et la présence ou non de ramifications et la taille moyenne du polymère. Les structures chimiques des polysaccharides doivent donc être contrôlées pour garantir leur efficacité dans les applications biotechnologiques.

Le cluster de gènes associé à la biosynthèse de l'EPS HE800 a été décrit en 2014, mais le mécanisme de biosynthèse, le rôle de chaque gène et les régulations impliquées ne sont pas parfaitement élucidés. Pour avancer sur la compréhension du mécanisme de biosynthèse, le cluster, constitué de 16 gènes, a été cloné chez *Escherichia coli*, un hôte aisément manipulable génétiquement, dont le métabolisme est bien connu. L'obtention d'une production recombinante chez cette bactérie constituerait un outil génétique pour mieux comprendre le rôle de chaque gène du cluster dans la biosynthèse du HE800, mais aussi pour améliorer le contrôle de sa production, et envisager la production de molécules fonctionnalisées.

Dans un premier temps, une étude bibliographique présentera les polysaccharides en général et leurs applications, puis se focalisera sur les polysaccharides bactériens marins et la production de GAG-mimétiques, dont fait partie l'exopolysaccharide HE800.

Après la description des matériels et des méthodes utilisés, les résultats seront présentés en quatre chapitres. Le premier présente une étude bioinformatique de la distribution chez les Vibrionaceae de clusters génétiques similaires à celui de la biosynthèse du HE800.

Le deuxième chapitre présente une étude transcriptomique menée chez *V. diabolicus* dans des conditions de culture favorisant ou non la synthèse du HE800. Le troisième chapitre présente les travaux menés en vue du clonage du cluster HE800 chez *E. coli*, la modification d'un des clones recombinants obtenus, ainsi que les tests de production effectués et enfin, une étude comparative de la transcription du cluster chez *V. diabolicus* et chez la souche recombinante. Le dernier chapitre de résultats rassemble des travaux inachevés, mais dont la stratégie et les premiers résultats présentent un intérêt pour poursuivre ce travail.

Première partie : Etude bibliographique

I. Les polysaccharides et leur importance en glycobioologie

A. Définition

Un polysaccharide est un polymère formé de plus de 10 monosaccharides, reliés par des liaisons osidiques. Les monosaccharides sont constitués de 3 à 8 atomes de carbone, selon la formule brute $C_n(H_2O)_n$ (Lehninger, 1982). Un des atomes de carbone est doublement lié à un atome d'oxygène, formant un groupement carbonyle (aldéhyde ou cétone). Sa position détermine alors la nature du monosaccharide ; placé à l'extrémité de la chaîne carbonée, c'est un aldose, sinon c'est un cétose (Lehninger, 1982). Ces monosaccharides peuvent également être oxydés, ou substitués avec d'autres fonctions, comme l'acide glucuronique (fonction acide) et la *N*-Acétylglucosamine (fonction acétyl) (Figure 1).

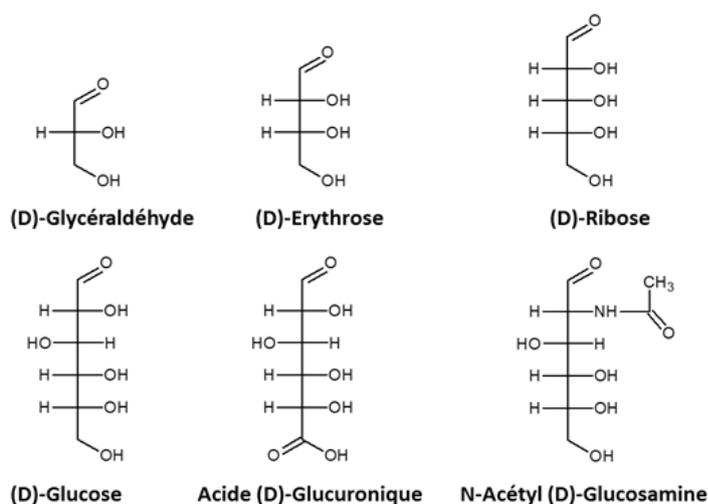


Figure 1 : Structure, en représentation de Fischer, d'oses à 3, 4, 5 et 6 carbones, d'un acide uronique et d'un ose substitué par un groupe *N*-Acétyl. Figure extraite de la thèse de V. Boursicot (2012).

Une liaison *O*-glycosidique entre deux monosaccharides est formée par la réaction de condensation entre le carbone anomérique d'un sucre et l'hydroxyle d'un autre (Figure 2) (Lehninger, 1982). La configuration de l'atome de carbone anomérique impliqué dans la liaison, détermine son type; elle peut être α ou β .

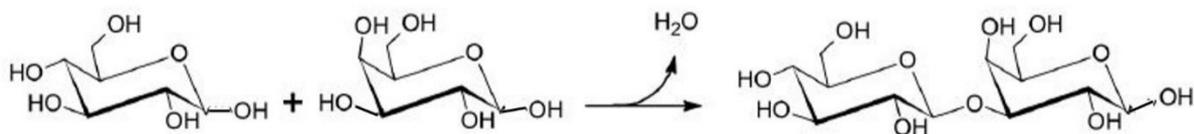


Figure 2 : Formation d'une liaison *O*-glycosidique.

Certains polysaccharides (PS) sont caractérisés par la répétition d'une unité composée de monosaccharides, si ces derniers sont identiques, il s'agit alors d'un homopolysaccharide et, dans le cas contraire, d'un hétéropolysaccharide (Sutherland, 1972). Un polysaccharide peut être sous forme ramifiée, linéaire, ou encore cyclique. Chaque ramification implique l'extrémité réductrice de son premier sucre, dans une liaison avec la chaîne osidique principale.

Les polysaccharides peuvent également être substitués par des groupements organiques (acétate, lactate, pyruvate) ou inorganiques (phosphate, sulfate, amines, amines acétylées).

Les polysaccharides ont la propriété d'être polydisperses, leur degré de polymérisation peut varier, résultant en des longueurs de chaînes différentes.

B. Applications biotechnologiques des polysaccharides

Les polysaccharides sont les polymères les plus représentés de la biosphère, ils sont produits à la fois par les animaux et les végétaux (plantes supérieures et algues), mais également les champignons, les levures et les bactéries.

Les polysaccharides utilisés en industrie sont majoritairement issus de végétaux et d'animaux. Quelques-uns sont synthétisés par des bactéries et utilisés dans des domaines variés tels que l'agroalimentaire, les biotechnologies, les industries du papier, de l'environnement et de la santé (Finore, Di Donato, Mastascusa, Nicolaus, & Poli, 2014). Le polysaccharide le plus abondant est la cellulose, le principal constituant des végétaux. Une molécule appelée cellulose bactérienne est également produite par différentes espèces de bactéries (Jonas & Farah, 1998). La cellulose, extraite des plantes où elle se trouve combinée à de la lignine et de l'hémicellulose, ou synthétisée par des bactéries, est couramment utilisée dans l'industrie du papier, du textile, des membranes et des emballages (Liebert, 2009). La cellulose est le matériau bio-renouvelable le plus étudié, avec une production annuelle estimée à 7.5×10^{10} tonnes (Klemm, 1998). L'amidon, quant à lui, constitue une molécule de réserve pour les végétaux et les algues, à l'instar du glycogène chez les animaux (Pfister & Zeeman, 2016). Les algues sont une source

de polysaccharides variés ; les alginates et les fucoïdanes sont produits par les algues brunes (Usov & Bilan, 2009), les carraghénanes par les algues rouges, les ulvanes par les algues vertes (Lahaye & Robic, 2007). Les fucanes ont été identifiés à la fois chez des algues brunes et des invertébrés marins (Bertheau & Mulloy, 2003). La chitine est produite par les arthropodes (insectes et crustacés), les mollusques et les champignons, il s'agit du second polysaccharide le plus abondant après la cellulose (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). Les bactéries produisent également des PS très diversifiés dont les principaux sont la gomme xanthane, produite par le phytopathogène *Xanthomonas campestris* (Lopes et al., 2015), les dextranes (*Leucosnotoc mesenteroides*), le gellane (*Sphingomonas paucimobilis*), le succinoglycane (*Sinorhizobium meliloti*, *Alcaligenes faecalis*), ainsi que le curdlane et les levanes produits par diverses espèces de bactéries. Par ailleurs, *Acetobacter xylinum* produit de la cellulose et *Pseudomonas aeruginosa* et *Azotobacter vinelandii* produisent de l'alginate (Freitas, Alves, & Reis, 2011; Kumar, Mody, & Jha, 2007).

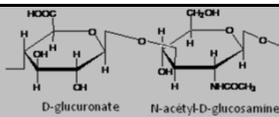
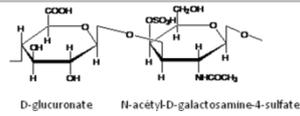
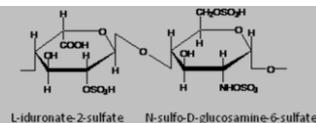
La gomme xanthane est utilisée dans les industries textiles, cosmétiques, pharmaceutiques, pétrolières et particulièrement en agro-alimentaire (Lopes et al., 2015). La production annuelle de gomme xanthane est estimée à 86 000 tonnes, soit un marché de 400 millions de dollars (Vorhoelter et al., 2008). Différentes souches de *Xanthomonas sp.* ont été évaluées. Le meilleur rendement permettant de conserver les propriétés rhéologiques du polymère, a été obtenu avec *Xanthomonas campestris* et est d'environ 10 g/L (Rottava et al., 2009).

La gomme gellane est produite par la bactérie *Sphingomonas paucimobilis* (Bajaj, Survase, Saudagar, & Singhal, 2007). L'unité répétitive de ce polysaccharide anionique et linéaire, est composée de rhamnose, de glucose et d'acide glucuronique, selon le ratio molaire 1 :2 :1 (Jansson, Lindberg, & Sandford, 1983). La gomme gellane est utilisée en alimentaire (Iurciuc, Savin, Lungu, Martin, & Popa, 2016), mais également en pharmacologie et en médecine en tant qu'excipient, et pour ses propriétés cicatrisantes, en ingénierie tissulaire (Osmalek, Froelich, & Tasarek, 2014).

Le succinoglycane est un hétéropolysaccharide produit par différentes souches des genres *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* et *Pseudomonas* (Zevenhuizen, 1997). L'unité répétitive de cet hétéropolysaccharide est composée de glucose et de galactose, selon le ratio molaire 7 :1, il est substitué avec du pyruvate, de l'acétate et du succinate (Miroslav & Stredansky, 2005). Il est impliqué dans des relations de symbiose entre des plantes et des bactéries (Leigh & Walker, 1994), et présente des applications dans l'industrie pétrolière ou cosmétique (Becker, Kuster, Niehaus, & Puhler, 1995; Glucksmann, Reuber, & Walker, 1993).

Chez les animaux, les glycosaminoglycanes (GAGs) comme la chondroïtine sulfate, l'acide hyaluronique ou l'héparine, sont des constituants du tissu conjonctif (DeAngelis, Liu, & Linhardt, 2013). Les glycosaminoglycanes sont de longues chaînes composées d'unités disaccharidiques répétitives, chaque unité étant composée d'un glucide aminé (*N*-Acétylglucosamine ou *N*-Acétylgalactosamine) et habituellement d'un acide uronique (Tableau I).

Tableau I : Structure de différents glycosaminoglycanes d'après Lamoureux et col. (Lamoureux, Baud'huin, Duplomb, Heymann, & Redini, 2007).

Glycosaminoglycanes	Structure
Acide hyaluronique	 <p>D-glucuronate N-acétyl-D-glucosamine</p>
Chondroïtine sulfate	 <p>D-glucuronate N-acétyl-D-galactosamine-4-sulfate</p>
Héparine et héparane sulfate	 <p>L-iduronate-2-sulfate N-sulfo-D-glucosamine-6-sulfate</p>

Les GAGs, à l'exception de l'acide hyaluronique, sont sulfatés. Leur composition, leur structure et leur masse moléculaire déterminent leurs propriétés. Chez les animaux, les GAGs sont liés à des protéines, l'ensemble constituant ainsi des protéoglycanes.

La chondroïtine sulfate présente différentes propriétés, notamment anti-inflammatoires, et est utilisée en traitement contre l'arthrite (Kobo, Ando, Mimura, Matsusue, & Mori, 2009; Lovu, Dumais, & du Souich, 2008; Ronca, Palmieri, Panicucci, & Ronca, 1998). Elle inhibe les enzymes de dégradation du cartilage et améliore la viscosité de la synovie (Belcher, Yaqub, Fawthrop, Bayliss, & Doherty, 1997; McCarty, Russell, & Seed, 2000). La chondroïtine sulfate est principalement obtenue par extraction de tissus animaux (porcs, bœufs, requins) (Kobo et al., 2009)

L'acide hyaluronique est un polysaccharide linéaire de 500 à 1 000 000 g/mol présent au sein des tissus épithéliaux et conjonctifs des animaux. Cette molécule est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation, du développement embryonnaire, de la cicatrisation, de l'inflammation et du cancer (Stern, Asari, & Sugahara, 2006). L'acide hyaluronique est également produit par certaines bactéries, comme les streptocoques, sous forme d'exopolysaccharides capsulaires, ce qui leur permet d'améliorer leur adhérence et leur résistance, mais constitue également un moyen de « duper » les défenses immunitaires de l'hôte, lors d'une infection (Wessels, Moses, Goldberg, & Dicesare, 1991).

En industrie, l'usage de l'acide hyaluronique est déterminé par sa masse moléculaire. Des molécules dont la masse est supérieure à 10 kDa sont souhaitées pour une utilisation en ophtalmologie, en orthopédie, en cosmétique et en ingénierie tissulaire (Allison & Grande-Allen, 2006; Fagien & Cassuto, 2012; Kogan, Soltes, Stern, & Gemeiner, 2007). Des molécules dont la masse est inférieure à 5 kDa sont requises pour la synthèse de composés impliqués dans l'angiogenèse, l'inhibition de tumeurs, l'expression de médiateur de l'inflammation (Jagannath & Ramachandran, 2010; Tammi et al., 2008). Le marché de l'acide hyaluronique est estimé à 2,5 milliards de dollars si l'on ne considère que le domaine de la visco-supplémentation chez l'homme (Sze, Brownlie, & Love, 2016). L'acide hyaluronique commercial est actuellement obtenu via deux procédés, d'une part l'extraction à partir de tissus animaux (crêtes de coq), et également par fermentation d'organismes bactériens (Sze et al., 2016).

L'héparine est un polysaccharide sulfaté (20-40 %) de 80 000 g/mol, synthétisé au sein de l'appareil de Golgi chez les animaux (Esko & Selleck, 2002). L'héparine est principalement utilisée comme anticoagulant depuis les années 1930 et est aujourd'hui un élément essentiel dans le traitement de thromboses (Linhardt, 2003). La fonction naturelle de l'héparine chez les animaux reste inconnue ; en effet, son activité anticoagulante ne semble pas impliquée, l'héparine est synthétisée dans les mastocytes et stockée dans les cellules, sans contact avec le système sanguin (Fu, Suflita, & Linhardt, 2016). L'implication de l'héparine dans la réponse des mastocytes au cours d'infections parasitaires a été suggérée (Kamhi, Joo, Dordick, & Linhardt, 2013; Linhardt, 2003). L'héparine a également des propriétés anti-inflammatoires, anti-virales et anti-cancéreuses (Hirsh, Anand, Halperin, & Fuster, 2001). La production annuelle d'héparine est estimée à 110 tonnes et représente un marché de 3 à 4 milliards de dollars (Bhaskar et al., 2012). L'héparine commerciale est extraite d'intestins de porcs et 57 % de la production est effectuée en Chine (Onishi, St Ange, Dordick, & Linhardt, 2016). L'unité pentasaccharidique responsable des effets anticoagulants et antithrombotiques de l'héparine a

été identifiée et synthétisée par voie chimique (Choay et al., 1983). Elle est actuellement commercialisée sous le nom d'héparine bas poids moléculaire (Petitou et al., 2002). Cette molécule présente toutefois des effets secondaires (saignements) (Crowther & Warkentin, 2008).

C. Extraction et production de polysaccharides d'intérêt biotechnologique

Compte-tenu des besoins importants vis-à-vis de certains polysaccharides, un des enjeux majeur pour l'industrie est d'optimiser les rendements de production. Ainsi, si l'on considère la production d'acide hyaluronique, l'extraction de cette molécule à partir de différentes matières animales a été testée notamment sur des cordons ombilicaux humains, du liquide synovial de bœuf, et des crêtes de coq. Le meilleur rendement a été obtenu à partir des crêtes de coq, 7, 5 ng/g de tissus (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997).

En ce qui concerne la production d'héparine, l'extraction à partir de foies de chien, de poumons de bœufs, puis d'intestins de porcs a été utilisée. En fonction de la matière première sélectionnée, des modifications fines de structure, entraînant des variations au niveau des activités biologiques de la molécule, ont été observées (Liu, Zhang, & Linhardt, 2009). Environ 300 mg d'héparine sont obtenus à partir d'un porc (Liu et al., 2009). Le sacrifice annuel d'au moins 1,2 milliards de porcs est donc nécessaire pour subvenir aux besoins mondiaux d'héparine (Fu et al., 2016). Les procédés d'extraction utilisés sont agressifs, nécessitant un broyage préalable, suivi de traitements à l'acide puis de plusieurs extractions à l'aide de solvants organiques (van der Meer, Kellenbach, & van den Bos, 2017). Ces techniques affectent non seulement le rendement des molécules d'intérêt, mais également leur polydispersité. La présence de molécules de différentes masses, pour un même polysaccharide, résulte de sa nature polydisperse. Les propriétés des polysaccharides dépendant de leurs masses, il est nécessaire de contrôler ce paramètre.

Le recours à l'extraction animale présente différents risques et inconvénients, comme les épidémies virales, les problèmes environnementaux et la surexploitation, autant de facteurs qui peuvent altérer la production d'héparine et présenter des risques pour la santé humaine (Zhou et al., 2008). En effet, il existe un risque de contamination des produits par des virus, des prions, pouvant entraîner la transmission d'infections (Shiedlin et al., 2004). Ainsi, en 2008, la contamination de lots d'héparine en provenance de Chine, par un variant sur-sulfaté de la chondroïtine sulfate, a entraîné la mort d'une centaine de personnes (Guerrini et al., 2008; Liu

et al., 2009). Dans le cas de l'acide hyaluronique, la molécule peut être liée à différentes protéines, comme la hyaluronidase (Fraser et al., 1997), ces contaminants peuvent également entraîner une réponse immunitaire indésirable.

La production en fermenteurs par des systèmes de production bactériens présente de nombreux avantages (substrats souvent peu coûteux, purification simplifiée) ; cependant des rendements supérieurs à 6-7 g/L sont difficiles à atteindre (Liu, Liu, Li, Du, & Chen, 2011). L'obtention de molécules par fermentation bactérienne permet en effet de s'affranchir de nombreux désagréments liés à l'extraction à partir de tissus animaux. Les fermentations sont effectuées sur quelques jours (généralement 2), il n'est donc plus nécessaire d'élever un grand nombre d'animaux, en prévision des besoins, et limite donc les risques de pénurie. La connaissance et la maîtrise des conditions de fermentation et des organismes bactériens utilisés permettent une meilleure reproductibilité des molécules obtenues en termes de rendement, de structure et de taille. Les risques de contamination par des prions ou des virus animaux sont également très réduits.

Une fois la fermentation bactérienne réalisée, les molécules d'intérêt doivent être extraites. La méthodologie choisie, dépend de la molécule à extraire, du type de contaminants possibles (protéines, ADN, enzymes...) et du degré de pureté requis en fonction des applications ultérieures envisagées (Sinquin & Collic-Jouault, 2014).

Dans un premier temps, il est nécessaire d'éliminer les bactéries de la culture, cette étape peut être réalisée par centrifugation, ce qui permet d'isoler l'EPS dans le surnageant sans altérer son intégrité (Kreyenschulte, Krull, & Margaritis, 2014). Il est possible de chauffer la culture afin de tuer les bactéries et inactiver d'éventuelles enzymes de dégradation du polymère (Freitas et al., 2011), mais cela peut entraîner une lyse cellulaire, et donc la libération dans le milieu de composés indésirables nécessitant une purification accrue.

L'isolement du polymère est ensuite réalisé par précipitation à l'alcool, ou par filtration/ultrafiltration. La première méthode peut entraîner une précipitation d'éléments indésirables, comme des protéines et des ions, avec le polysaccharide (Kumar et al., 2007). La filtration et l'ultrafiltration permettent de sélectionner un seuil de coupure pour la séparation des composés en fonction de leur taille (Kreyenschulte et al., 2014).

D'autres traitements peuvent ensuite être appliqués, dans le but de purifier le polymère obtenu : précipitations, traitement enzymatique ou chimique. Ces traitements doivent être choisis en adéquation avec le degré de pureté souhaité, car de tels traitements altèrent le rendement de

l'extraction (Freitas et al., 2011). Le polysaccharide est ensuite lyophilisé pour une meilleure conservation.

L'ensemble des moyens utilisés est donc moins « lourd » que ceux nécessaires à l'extraction de polymères à partir de tissus animaux.

D. Diversité des polysaccharides de bactéries marines et leurs propriétés

Les océans représentent 70 % de la biosphère. Ils sont caractérisés par des écosystèmes variés, abritant une biodiversité riche, bien loin d'avoir livré tous ses secrets. L'univers marin constitue donc un réservoir de ressources encore inexplorées, pour la quête de nouvelles molécules bioactives.

Des PS bactériens marins ont déjà été identifiés. Ainsi le spirulane, synthétisé par la cyanobactérie *Arthrospira platensis*, est un polysaccharide sulfaté ayant démontré des propriétés anticoagulantes, comme l'héparine, ainsi que des activités antivirales (Hayashi, Hayashi, & Kojima, 1996; Kaji et al., 2004). Ces activités sont d'autant plus intéressantes que le spirulane, au contraire de l'héparine, n'est pas un glycosaminoglycane : il contient des traces d'acide glucuronique, mais aucun hexosamine n'a été identifié au sein de sa structure. Le spirulane est donc un GAG-mimétique.

La bactérie *Pseudoalteromonas sp.* AM, isolée de la Mer Rouge (Egypte), synthétise un homopolysaccharide de glucose, ayant des activités antivirales contre l'herpes simplex (HSV-I) (Al-Nahas, Darwish, Ali, & Amin, 2011).

La bactérie *Vibrio furnissii* strain VB0S3 a été isolée près des côtes indiennes, elle produit un hétéropolysaccharide de glucose, de galactose et d'acides uroniques, ayant des propriétés émulsifiantes (Bramhachari et al., 2007). La bactérie *Vibrio sp.* QY101 a été isolée d'algues brunes et produit un hétéropolysaccharide constitué d'acide galacturonique, d'acide glucuronique, de rhamnose et de glucosamine et capable d'inhiber la formation de biofilms par différentes bactéries, et d'en détruire certains. Cet EPS pourrait donc avoir des applications contre les infections associées à des biofilms (Jiang et al., 2011).

La bactérie *Paracoccus zeaxanthifaciens* subsp. *payriae* a été isolée d'un tapis microbien en Polynésie française, un environnement caractérisé par des paramètres variables en terme de salinité, pH et température. Cette bactérie synthétise un polysaccharide capable de fixer les sels

de cuivre et de fer, ce qui pourrait avoir des applications dans l'industrie des métaux, et la lutte contre la pollution (Guézennec et al., 2011).

Les écosystèmes hydrothermaux profonds, en raison des conditions particulières qui y règnent, gradients de température, de pression, de pH, forte concentration en composés toxiques, ont été explorés. Des organismes adaptés à de telles conditions de vie pourraient produire des molécules encore inconnues, aux propriétés prometteuses.

Deux bactéries à fort potentiel ont ainsi été collectées au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes, *Alteromonas infernus*, isolée de *Riftia pachyptila*, et le sujet de cette thèse, *V. diabolicus*, isolée des téguments dorsaux d' *Alvinella pompejana*, à 2600 mètres de profondeur (Raguènes, Christen, Guézennec, Pignet, & Barbier, 1997; Raguènes et al., 1997). *Alteromonas infernus* produit un hétéropolysaccharide sulfaté composé de glucose, de galactose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique (Jouault et al., 2001). Le polysaccharide de *V. diabolicus*, appelé HE800, présente une homologie structurale avec l'acide hyaluronique ; il est entièrement composé d'acide glucuronique et d'hexosamines, ce qui est rare pour un polysaccharide bactérien (Rougeaux, Kervarec, Pichon, & Guézennec, 1999b). Le HE800 natif de *V. diabolicus* a déjà démontré des propriétés cicatrisantes, après avoir été utilisé comme implant de comblement osseux chez le rat (Zanchetta, Lagarde, & Guézennec, 2003b). De plus, l'incorporation des polysaccharides de *V. diabolicus* et d'*Alteromonas infernus* dans un hydrogel injectable permet d'accroître la viabilité et la prolifération cellulaire (Rederstorff et al., 2011a).

Cet aperçu sur les possibilités offertes par les polysaccharides bactériens marins n'est bien sûr pas exhaustif, ceux qui ont été associés à des propriétés biologiques et dont la composition, sinon la structure, est connue, ont été principalement retenus.

La valorisation des polysaccharides des bactéries marines se heurte à plusieurs difficultés, à différents niveaux. Parmi les bactéries collectées ne sont bien sûr retenues que celles qui sont cultivables en laboratoire. Déterminer quelles sont les meilleures conditions de culture pour l'expression d'un EPS chez une nouvelle bactérie peut être un défi, sachant que ces conditions peuvent influencer sur la composition et la structure dudit polysaccharide, des paramètres sur lesquels reposent ses propriétés éventuelles.

Dans la littérature, des espèces ont été associées à la production de polysaccharide, la composition du polymère, qui peut être élucidée par chromatographie en phase gazeuse, est rarement décrite et la structure, obtenue par RMN, est encore plus rarement étudiée.

Les polysaccharides ont des applications variées. Lorsqu'une nouvelle molécule est découverte, des tests adéquats doivent être mis en place, afin de déterminer ses éventuelles propriétés pour tel ou tel domaine. Le criblage des propriétés des polysaccharides est un défi supplémentaire.

E. Mécanisme de biosynthèse des polysaccharides bactériens

Les polysaccharides bactériens sont classés en fonction de leur compartimentation cellulaire. Les polysaccharides intracellulaires tels l'amidon et le glycogène, constituent des réserves d'énergie pour la cellule. Les lipopolysaccharides (LPS), caractéristiques des bactéries à Gram-négatif, ont essentiellement un rôle structural dans l'intégrité des membranes. Enfin les polysaccharides extracellulaires, regroupant les CPS, ou polysaccharides capsulaires, et les polysaccharides excrétés, soient les exopolysaccharides ou EPS. Les CPS ont essentiellement un rôle de protection, ou d'interaction avec l'hôte dans le cas de certains pathogènes (Wessels et al., 1991). Les EPS ont différents rôles, de protection contre la dessiccation notamment, ils peuvent être impliqués dans l'établissement d'un biofilm, qui leur permet alors de piéger des nutriments ou des composés toxiques, ou encore d'établir des relations de symbioses (*V. fischeri*) (S. Shibata, E. S. Yip, K. P. Quirke, J. M. Ondrey, & K. L. Visick, 2012).

Les LPS comportent trois éléments. Le lipide A, composé de monosaccharides et d'acides gras, ancre la molécule dans le feuillet externe de la membrane externe ; le cœur oligosaccharidique est composé de sucres et de dérivés de sucre, comme l'acide 3-déoxy-D-manno-octulosonique (Kdo). Enfin, l'antigène O, est un polysaccharide accroché au cœur oligosaccharidique, constitué d'unités répétitives (10-30) d'oligosaccharides (3-6) (Reeves et al., 1996). La distinction entre les LPS et les différentes formes d'EPS n'est pas toujours aisée (L & Gyles, 1994).

Les CPS forment une gangue protectrice autour de la cellule, par liaison covalente. Le CPS peut se lier au lipide A des LPS donnant ainsi un K_{LPS} (Dodgson, Amor, & Whitfield, 1996). Les CPS confèrent parfois un aspect mucoïde aux colonies cultivées sur milieu solide. Leur nature et leur composition dépend de la souche concernée (Simelyte, Rimpilainen, Zhang, & Toivanen, 2003).

Les polysaccharides bactériens synthétisés et sécrétés dans le milieu extracellulaire, ou directement synthétisés à l'extérieur par des enzymes ancrées dans la membrane, sont dénommés exopolysaccharides (EPS). Les EPS bactériens sont très variés et peuvent être classés en fonction de leur structure chimique, de leurs propriétés rhéologiques ou biologiques,

du type de liaisons qu'ils comportent, ou encore de leur poids moléculaire (Nwodo, Green, & Okoh, 2012). Ils peuvent également conférer un aspect mucoïde aux colonies.

La biosynthèse des EPS chez les bactéries peut s'effectuer de plusieurs manières, en fonction du mécanisme d'export et de la localisation de la polymérase. Certains EPS sont entièrement synthétisés à l'extérieur de la cellule. Ainsi, l'assemblage a lieu dans le milieu extracellulaire, par des enzymes excrétées par la bactérie. Cette technique a été mise en évidence chez différents organismes ; *Leuconostoc spp.* et *Streptococcus spp.* pour la production de dextrane, ou encore *Bacillus subtilis* pour la production de levane (P. & Vanhooren, 1998). Ainsi, chez *Leuconostoc mesenteroides*, la production de dextrane-saccharase est induite par le substrat de l'enzyme, le saccharose. L'enzyme est excrétée et, fixée à la membrane externe de la cellule ou même libérée dans le milieu, elle hydrolyse le saccharose, libère le fructose et transfère le glucose sur le polymère en élévation (Monchois, RemaudSimeon, Russell, Monsan, & Willemot, 1997).

Lorsque l'assemblage des PS se fait au moins en partie dans le milieu intracellulaire, 3 mécanismes sont décrits. Dans deux cas, les unités répétitives sont synthétisées dans le cytoplasme, à proximité de la membrane, puis exportées pour être assemblées à l'extérieur. Les systèmes d'export membranaire des EPS sont le système ABC-transporteur dépendant et le système WZX/WZY dépendant (Figure 3). Toutes les étapes de cette voie ne sont pas complètement comprises ; notamment celles permettant la détermination de la longueur de chaîne, (Sa-Correia et al., 2002). Le troisième mécanisme, dit synthase dépendant, fait appel à une enzyme multifonctionnelle qui catalyse à la fois l'assemblage des oses et l'exportation du polymère en élévation. Ce mécanisme a été mis en évidence pour la biosynthèse de l'acide hyaluronique et de la cellulose (Romling, 2002; Weigel & DeAngelis, 2007). Le processus de polymérisation et d'export n'est pas encore vraiment élucidé (Keenleyside & Whitfield, 1996; Weigel & DeAngelis, 2007).

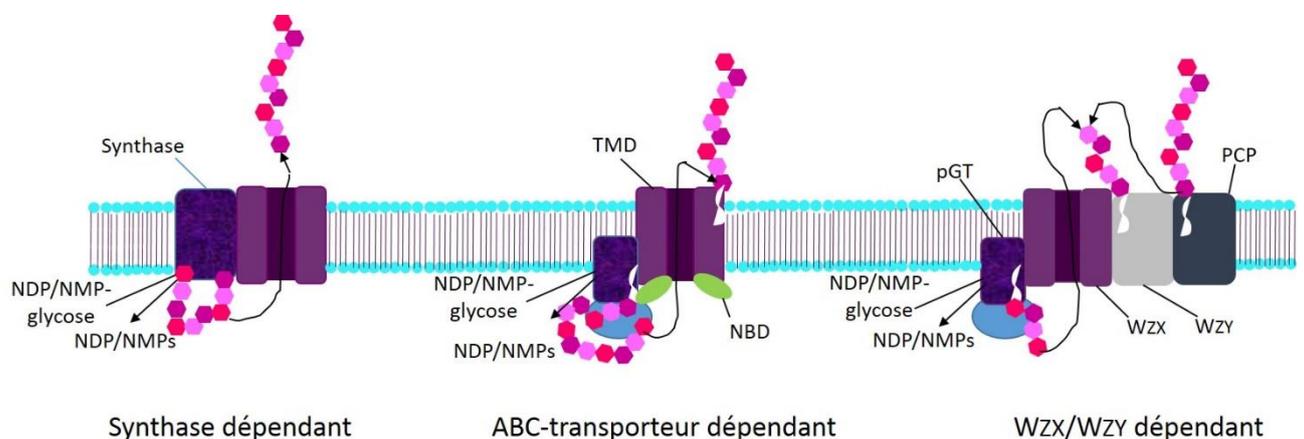


Figure 3 : Mécanismes potentiels de biosynthèse des polysaccharides chez les bactéries, d'après Cuthbertson (Cuthbertson, Kos, & Whitfield, 2010). TMD : domaine transmembranaire, PCP : co-polymérase polysaccharidique, NBD : domaine de fixation de nucléotides.

Dans le cas du mécanisme ABC-transporteur dépendant, l'EPS est assemblé dans le cytoplasme, sur un accepteur lipidique de la membrane, avant d'être exporté via l'ABC-transporteur. Ces molécules sont caractérisées par la présence de deux domaines transmembranaires (TMD pour TransMembrane Domain), associés à deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD pour Nucléotides Binding Domain) (Locher, Lee, & Rees, 2002; Mourez, Hofnung, & Dassa, 1997). En plus du transporteur ABC, deux protéines additionnelles sont requises pour l'export de l'EPS. Elles appartiennent à deux familles distinctes, celle des Outer membrane Polysaccharide eXport (OPX), et celle des Polysaccharide CoPolymérase 3 (PCP3), cette dernière jouant le rôle d'un adaptateur entre l'OPX et le transporteur ABC.

Dans le cas du mécanisme WZX/WZY dépendant, la polymérisation est initiée par une enzyme intracellulaire (la priming glycosyltransférase), qui transfère le premier sucre activé sur un accepteur lipidique membranaire, l'undécaprényl diphosphate (und-PP). Les glycosyltransférases assemblent le reste de l'unité répétitive, qui est alors exportée hors de la membrane interne par une flippase (WZX). La polymérase WZY assure la fixation de cette unité néoformée sur la chaîne de l'EPS (Woodward et al., 2010). La protéine WZC appartenant à la famille des PCP est impliquée dans le contrôle de la longueur de chaîne de l'EPS, le mécanisme opératoire est encore mal connu (Ayabe-Chujo, Usami, Yoshida, Omori, & Nojiri, 2012). Des gènes codant pour le mécanisme WZX/WZY dépendant ont été identifiés au sein du cluster génétique de l'EPS HE800 de *V. diabolicus* (Goudenege et al., 2014).

II. La production de polysaccharides GAG-mimétiques par les bactéries

La production de GAG-mimétiques par les bactéries, présente de nombreux avantages, par rapport à l'extraction de GAGs de tissus animaux.

A. L'acide hyaluronique produit par *Streptococcus* sp.

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide linéaire, son unité répétitive disaccharidique est composée d'un acide D-glucuronique et d'une D-glucosamine N-acétylée (Figure 4). Il est

négativement chargé, ce qui lui permet de fixer une grande quantité d'eau (Sze et al., 2016). Il s'agit du seul glycosaminoglycane connu non sulfaté, sa taille varie de 500 à 1 000 000 g/mol.

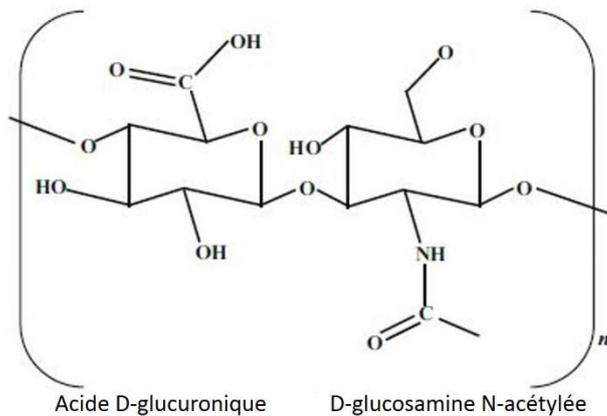


Figure 4 : Structure de l'acide hyaluronique.

L'acide hyaluronique est naturellement produit par différentes bactéries pathogènes : *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, *Pasteurella multocida* et *Cryptococcus neoformans* (Blank, Hugenholtz, & Nielsen, 2008; DeAngelis, Jing, Drake, & Achyuthan, 1998; Deangelis, Papaconstantinou, & Weigel, 1993; Jong et al., 2007). La première bactérie utilisée pour la production industrielle d'acide hyaluronique est *Streptococcus zooepidemicus* (Chong & Nielsen, 2003a, 2003b; J. Krahulec & Krahulcova, 2006).

Chez *S. zooepidemicus* (Figure 5) deux séries de réactions permettent d'obtenir, à partir du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate, l'UDP-acide glucuronique et l'UDP-N-Acetylglucosamine, qui permettront d'obtenir l'acide hyaluronique après assemblage par la synthase.

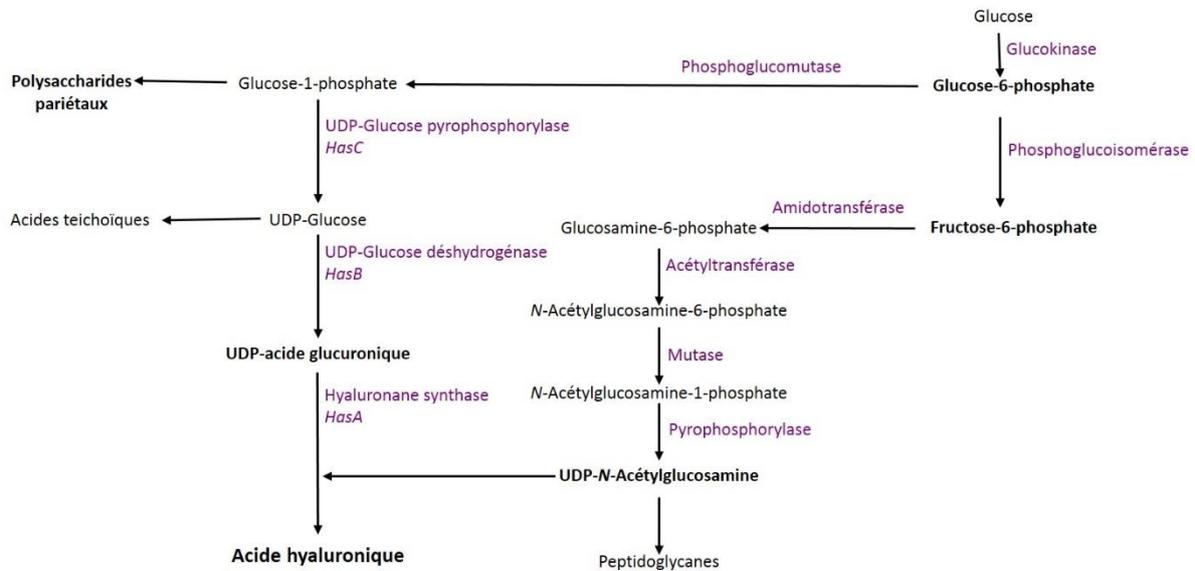


Figure 5 : Voie de biosynthèse de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*.

La voie de biosynthèse de l'acide hyaluronique est en compétition, pour les mêmes précurseurs, avec la croissance cellulaire (synthèse de polysaccharides pariétaux) (Figure 5). Il a déjà été observé qu'une forte croissance cellulaire ne permettait pas d'obtenir un bon rendement d'acide hyaluronique (Armstrong, Cooney, & Johns, 1997).

Différentes études ont été menées, afin d'optimiser la production d'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*, notamment en tenant compte de ce phénomène de compétition. Ainsi, une limitation de la croissance bactérienne par l'induction d'un stress alcalin régulier (pH variant de 7 à 8,5 toutes les 2 heures), a permis d'accroître la production de 5 à 7,5 g/L (L. Liu, Wang, Du, & Chen, 2008). En raison de la viscosité des cultures, l'oxygénation influe également sur la production (Armstrong et al., 1997). Ainsi, les cultures aérobies permettent d'obtenir plus d'acide hyaluronique que des cultures équivalentes, mais effectuées en anaérobie (Johns, Goh, & Oeggerli, 1994). Différents modes de fermentation ont été comparés, culture continue, culture batch et culture fed batch (Blank, McLaughlin, & Nielsen, 2005; Chen, Chen, Huang, & Chen, 2009; Don & Shoparwe, 2010; Huang, Chen, & Chen, 2008; Im, Song, Kang, & Kang, 2009; Liu, Du, Chen, Wang, & Sun, 2008; Vazquez, Montemayor, Fraguas, & Murado, 2010). La combinaison de 8 heures de culture fed batch (saccharose 1 g/L), suivies de 8 à 20 heures de culture batch (concentration initiale de saccharose de 15 g/L), a permis d'augmenter la production d'acide hyaluronique de 32 % par rapport à une culture batch seule (Liu, Du, et al., 2008).

Afin de diminuer les coûts de production de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*, des déchets d'autres industries ont été testés comme substrats ; eaux utilisées lors de la transformation de produits de la mer, peptone issue de viscères de thon, ce qui pourrait réduire les coûts de production de 30 % et serait plus écologique (Vazquez et al., 2010; Vazquez et al., 2013). Les restes de production de noix de cajou ont également montré un intérêt (Pires, Macedo, Eguchi, & Santana, 2010).

B. *E. coli* K4 et K5

Escherichia coli K4 synthétise un polysaccharide capsulaire, appelé CPS K4. Le CPS K4 est un précurseur de la chondroïtine sulfate, un glycosaminoglycane dont l'unité disaccharidique est composée d'un résidu d'acide glucuronique et d'un résidu de N-Acétylgalactosamine, sulfaté. Le CPS K4 est substitué par du fructose en position C3 de l'acide glucuronique et a pour structure chimique (GalNAc-GlcA-(fructose))_n (Rodriguez, Jann, & Jann, 1988) . La bactérie *E. coli* est un pathogène présentant différents facteurs de virulence (Cress et al., 2014), à l'origine d'infections urinaires (Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008). Les polysaccharides capsulaires des bactéries pathogènes telles qu'*E. coli* K4, sont généralement composés de sucres qui leur assurent un mimétisme avec les zones d'infection de leurs hôtes, afin de duper leurs systèmes immunitaires (Cress et al., 2014).

Chez *E. coli* K4, la synthèse du CPS K4 repose sur un cluster de 7 gènes, nommés de *kfoA* à *kfoG* (Figure 6), qui permettent à la fois la synthèse des précurseurs et leur assemblage en CPS K4. Les fonctions de KfoB, KfoD et KfoG ne sont pas encore élucidées (Doherty, Weaver, Miyamoto & Minimisawa, 2014; Krahulec, Krahulcova, Medova, & Velebny, 2005; Ninomiya et al., 2002).

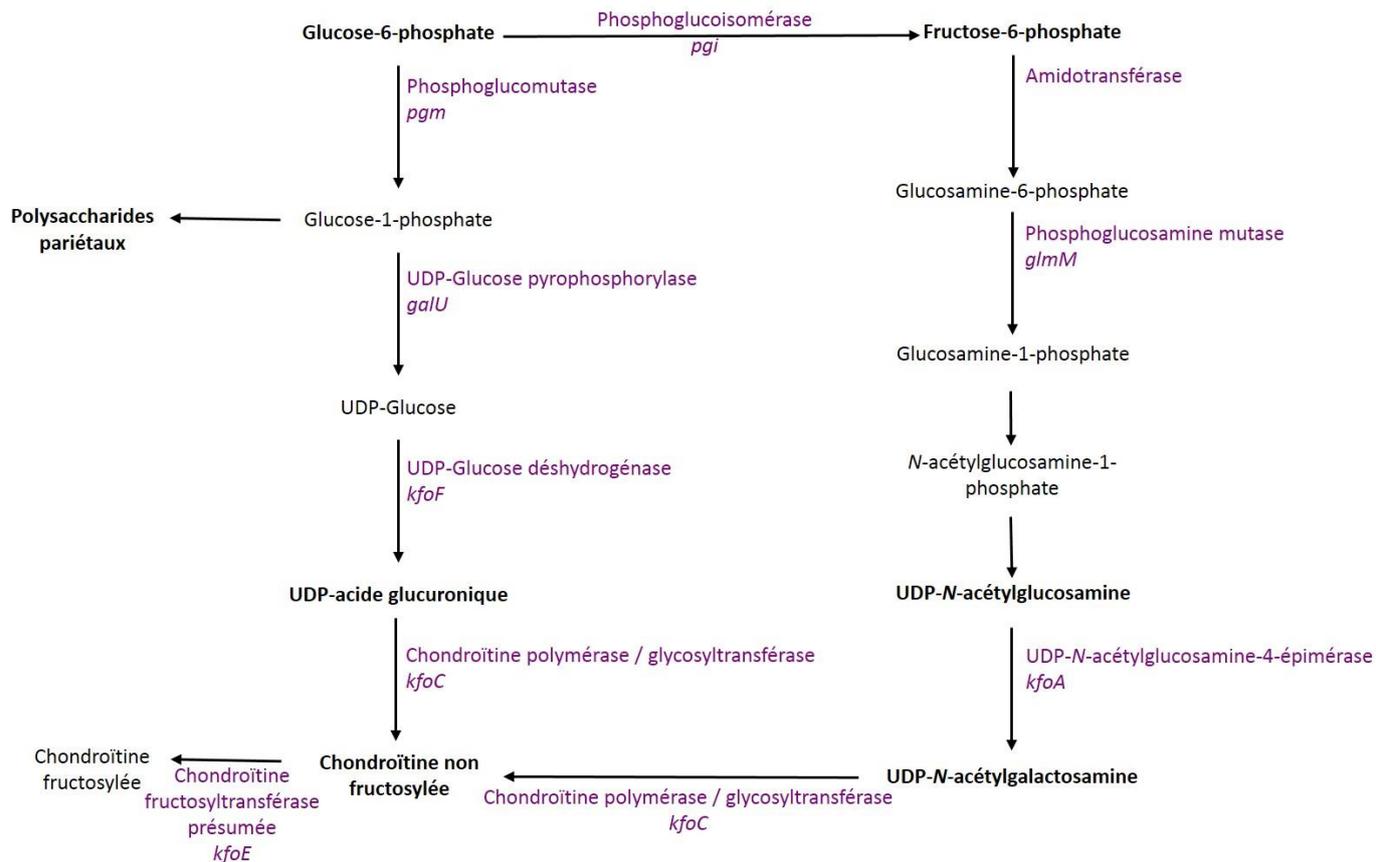


Figure 6 : Voie métabolique de la synthèse du polysaccharide capsulaire K4 chez *E. coli* K4.

Une étude physiologique a été menée pour améliorer la production du CPS K4 chez *E. coli* K4 (Cimini, Restaino, Catapano, De Rosa, & Schiraldi, 2010). Une culture fed batch, effectuée à partir du milieu élaboré dans un réacteur de 2 L, a alors permis d'obtenir 1,4 g/L de polysaccharides capsulaires, soit 10 et 5 fois plus respectivement, que pour une culture de volume équivalent en erlenmeyer et culture batch (Cimini et al., 2010). L'utilisation d'un bioréacteur à membranes de microfiltration a également permis d'obtenir plus de 4 g/L de polysaccharides capsulaires (Restaino, Cimini, De Rosa, Catapano, & Schiraldi, 2011). La supplémentation du milieu de culture avec les sucres qui composent le CPS K4 a également fourni des résultats prometteurs. En milieu contenant du glycérol comme source de carbone, *E. coli* K4 est capable d'utiliser un apport en *N*-Acétylgalactosamine et en acide glucuronique pour accroître sa production de CPS K4 (effet optimal à une concentration de 0,385 mM). Un effet similaire est obtenu avec un apport en fructose équivalent (+ 60% de production de CPS K4 par rapport au contrôle) (Restaino et al., 2013).

L'unité répétitive du polysaccharide capsulaire d'*E. coli* K5, l'héparosane, est composée d'un résidu d'acide glucuronique et d'un résidu de *N*-Acétylglucosamine. L'héparosane est le précurseur de l'héparine et de l'héparane sulfate chez les eucaryotes. Ces molécules présentent différentes activités biologiques d'intérêt; anticoagulation, anti-inflammation, et anti-cancer (Linhardt, 2003; Onishi et al., 2016). L'héparine, principalement utilisée pour ses propriétés anticoagulantes, est actuellement extraite à partir d'intestins de porcs (Linhardt, 2003). Ce type de production peut être sujet à contamination (H. Y. Liu et al., 2009). L'obtention de molécules ayant les mêmes propriétés que l'héparine, à partir d'héparosane bactérien, permettrait de s'affranchir des inconvénients liés à la production animale (J. H. Chen et al., 2005; Kuberan, Beeler, Lech, Wu, & Rosenberg, 2003; Lindahl et al., 2005; Z. Q. Zhang et al., 2008). La masse moléculaire du polysaccharide capsulaire K5 produit par *E. coli* K5, varie de 10 à 20 KDa, elle est donc proche de celle de l'héparine (Manzoni, Bergomi, & Cavazzoni, 1996; Wang et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Chez *E. coli* K5 (Figure 7) les glycosyltransférases, codées par les gènes *kfiA* et *kfiC*, permettent d'assembler l'unité répétitive de l'héparosane, à partir d'UDP-acide glucuronique et d'UDP-*N*-Acétylglucosamine. Comme pour la production de polysaccharide capsulaire K4 et d'acide hyaluronique, la voie de biosynthèse aboutissant à la formation d'UDP-acide glucuronique est en compétition avec la synthèse de polysaccharides pariétaux (croissance cellulaire) (Figure7).

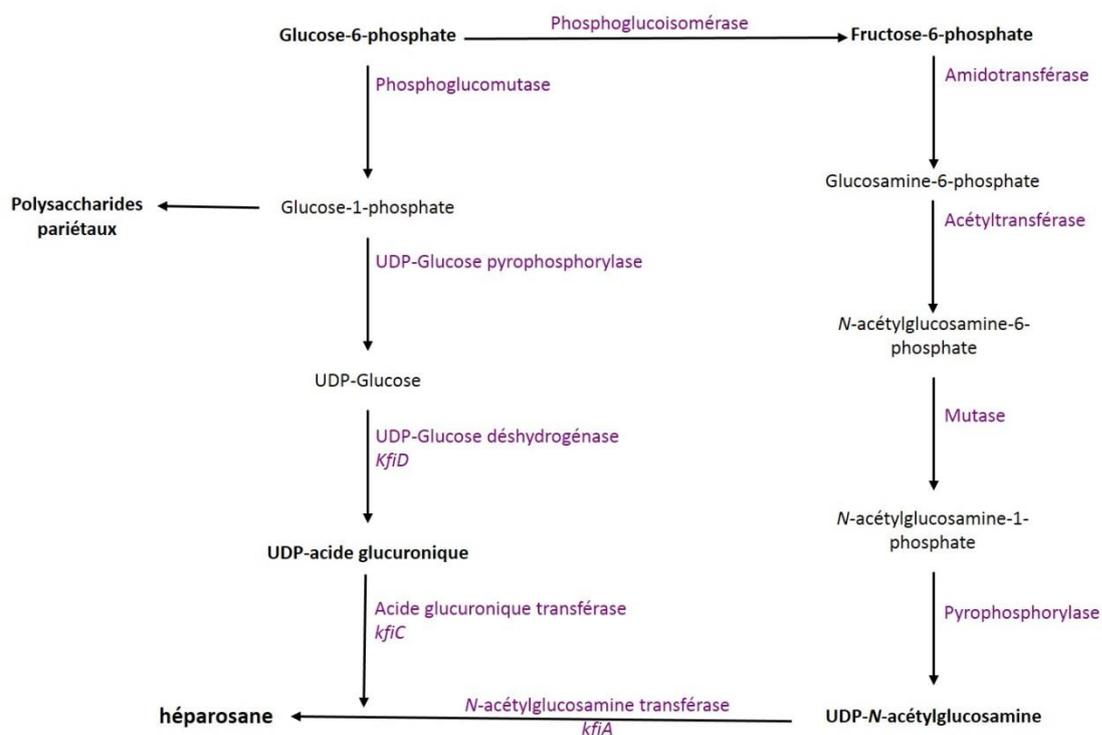


Figure 7 : Voie de biosynthèse de l'héparosane chez *E. coli* K5.

Des études physiologiques ont été menées pour améliorer la production de polysaccharides capsulaires K5. D'après une comparaison de différentes sources de carbone, une plus grande quantité d'héparosane est obtenue à partir de glycérol (187 mg/L), plutôt qu'avec du glucose (148 mg/L) (Y. F. Liu et al., 2012). Récemment, il a été montré que, comme dans le cas de la production de polysaccharides capsulaires K4 chez *E. coli* K4 (Restaino et al., 2013), une supplémentation des cultures avec les sucres composant le polysaccharide capsulaire K5, permet d'augmenter sa production par *E. coli* K5 (1,8 fois comparativement au glycérol seul) (Restaino, di Lauro, Di Nuzzo, De Rosa, & Schiraldi, 2017).

III. Les EPS à l'ère de la biologie de synthèse

A. Modification d'EPS naturels *in vitro*

Les propriétés des exopolysaccharides reposent sur leur structure chimique. La composition en sucres, les types de liaisons et les substituants présents au sein de l'EPS, déterminent ses interactions avec les autres molécules (Kumar et al., 2007; Pomin, 2009; Powell, Yates, Fernig, & Turnbull, 2004). Ainsi, les propriétés anticoagulantes de l'héparine sont notamment liées à la présence de sulfates (S. J. Chen et al., 2009; Garg et al., 2002; J. Liu & Pedersen, 2007). La masse moléculaire joue également un rôle, comme l'illustre le cas de l'acide hyaluronique (Allison & Grande-Allen, 2006; Fagien & Cassuto, 2012; Jagannath & Ramachandran, 2010; Kogan et al., 2007; Tammi et al., 2008).

Compte-tenu de ces spécificités, les modifications des structures d'EPS par dépolymérisation et sulfatation ont été étudiées, pour améliorer leurs activités biologiques ou en induire de nouvelles (Chopin, Guillory, Weiss, Le Bideau, & Collic-Jouault, 2014). Différentes méthodes chimiques ont été utilisées (Laurienzo, 2010; Senni et al., 2011).

Afin de réduire la taille des exopolysaccharides de masse moléculaire élevée (HMW), différentes techniques de dépolymérisation ont été évaluées : l'ozonolyse en solution aqueuse (Wang, Hollingsworth, & Kasper, 1999), la dépolymérisation oxydative (Balakrishnan, Lesieur, Labarre, & Jayakrishnan, 2005), la dépolymérisation radicalaire (Nardella et al., 1996), ou encore par hydrolyse acide (Collic, Boissonvidal, & Jozefonvicz, 1994).

La sulfatation des EPS a d'abord été réalisée par voie chimique ; le trioxyde de soufre sous forme de sel de pyridinium, la pipéridine avec l'acide sulfonique, le sulfite de sodium et l'acide

chlorosulfonique sont les donneurs de sulfate les plus utilisés (Laurienzo, 2010). La principale difficulté de ces méthodes concerne la régiosélectivité, il n'est en effet pas possible de choisir la position des sulfates sur la molécule (Al-Horani & Desai, 2010). Par ailleurs, l'utilisation de produits chimiques doit être de plus en plus évitée.

Des dérivés de petite masse moléculaire (LMW) de l'EPS HE800 de *V. diabolica* et de l'EPS GY785 d'*Alteromonas inferna* ont été obtenus par hydrolyse acide ou dépolymérisation radicalaire puis sulfatés avec la pyridine sulfate (Jouault et al., 2001; Senni et al., 2011). Ces molécules modifiées se sont révélées dotées d'activités biologiques comparables à celles de l'héparine ou d'autres glycosaminoglycanes sulfatés (Senni et al., 2013; Senni et al., 2011; Velasco et al., 2011).

Plus récemment, des méthodes de modifications enzymatiques ont été envisagées. La spécificité des enzymes permettrait un meilleur contrôle des modifications effectuées, s'affranchissant ainsi de la régiosélectivité inhérente à l'utilisation de produits chimiques néfastes pour l'environnement (DeAngelis et al., 2013). En ce qui concerne la dépolymérisation, il est généralement nécessaire de mettre au point des criblages pour chercher des enzymes capables d'effectuer cette tâche. Par cette méthode, il a été démontré que l'enzyme N-acétylgalactosaminidase d'*Enterococcus faecalis* est capable de dépolymériser l'EPS HE800 de *V. diabolica* (Rigouin et al., 2012). Le procédé de sulfatation pourrait être réalisé par des enzymes de type sulfotransférases, ces enzymes peuvent être recherchées au sein de bactéries produisant naturellement des EPS sulfatés. La combinaison de méthodes chimiques et enzymatiques, a permis d'obtenir, à partir du polysaccharide capsulaire K5, une molécule ayant des propriétés similaires à celles de l'héparine (Lindahl et al., 2005; Urbinati et al., 2004). Ces procédés ne permettent pas de subvenir aux importants besoins actuels d'héparine à travers le monde. Actuellement, la production d'héparine de synthèse doit composer avec différentes difficultés ; les procédés comportent de nombreuses étapes, les produits obtenus sont parfois hétérogènes (longueur de chaîne) et sont soumis à une réglementation stricte, alors que le prix de l'héparine extraite du porc est relativement bas (15-20 \$/g) (Onishi et al., 2016). D'autres solutions sont donc à envisager, telle l'ingénierie métabolique, afin d'obtenir à partir de bactéries, des molécules au plus proche des résultats attendus, et limiter les traitements ultérieurs aux fermentations (Schmid, Sieber, & Rehm, 2015; Schmid, Sperl, & Sieber, 2014).

B. Ingénierie métabolique pour la production d'EPS : K4 et K5

Afin d'améliorer la production d'EPS d'intérêt, l'ingénierie métabolique a également été envisagée en complément d'études physiologiques. Cette stratégie consiste à identifier les métabolites limitant au sein d'une voie de biosynthèse, et accroître leur disponibilité en sur-exprimant ou dupliquant les gènes responsables de leur production.

Chez *E. coli* K5, l'UDP-glucose déshydrogénase qui permet d'obtenir de l'UDP-acide glucuronique à partir d'UDP-glucose, est considérée comme limitante, d'après une étude sur la biosynthèse de glycosaminoglycanes chez les mammifères (Roman, Roberts, Lidholt, & Kusche-Gullberg, 2003). Cette enzyme est connue pour être faiblement active chez les bactéries non pathogènes (Mao, Shin, & Chen, 2009). La surexpression de l'UDP-glucose déshydrogénase chez *E. coli* K5 a entraîné une diminution de la synthèse d'héparosane, sans modification de la longueur de chaîne des molécules (Figure 8) (Roman et al., 2003). Il est possible que cette modification, en entraînant une disponibilité moindre de glucose-6-phosphate, soit responsable d'une diminution de la disponibilité du second précurseur de l'héparosane, l'UDP-GlcNAc (Wang et al., 2010). Un équilibre au niveau de la synthèse des précurseurs est certainement nécessaire à l'amélioration de la production de l'EPS.

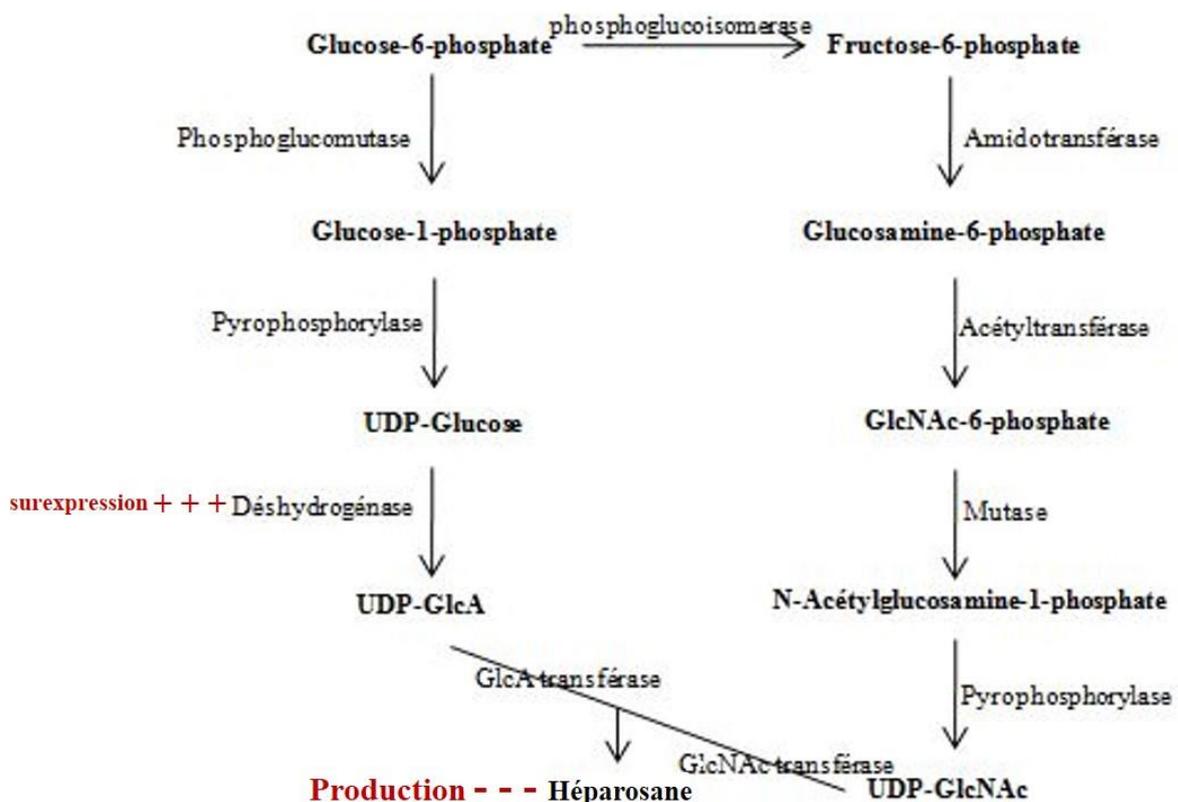


Figure 8 : Surexpression de l'UDP-glucose déshydrogénase chez *E.coli* K5.

L'héparosane est un polysaccharide capsulaire, une partie des molécules restent liées aux cellules tandis que d'autres sont libérées dans le surnageant. Une étude de mutagenèse par transposons a mis en évidence le rôle du gène *waaR*, impliqué dans l'attachement des molécules d'héparosane à la surface des cellules. Une mutation dans ce gène a entraîné une augmentation de la libération d'héparosane dans le surnageant de 33 à 77 % (Taylor, Goldrick, Lord, & Roberts, 2006).

L'enzyme K5 lyase, produite par un phage d'*E. coli* et capable de dépolymériser l'héparosane, a également été envisagée comme outil pour réduire sa masse moléculaire).

C. Production hétérologue

Il a également été envisagé de produire les polysaccharides d'intérêt de façon recombinante. Ainsi, en choisissant un hôte approprié, la production peut être améliorée, exempte de toxines (endotoxines chez les bactéries à Gram-négatif), ou encore génétiquement modifiée plus facilement.

Afin de s'affranchir des toxines produites par les streptocoques, différents organismes ont été génétiquement modifiés afin de produire de l'acide hyaluronique : *Bacillus* (Widner et al., 2005), *Agrobacterium* (Mao & Chen, 2007), *E. coli* (Mao et al., 2009) et *Lactococcus* (Chien & Lee, 2007).

La production recombinante d'acide hyaluronique a été réalisée chez *E. coli* JM109 par le clonage d'un exemplaire du gène de l'acide hyaluronique synthase de *Pasteurella multocida*, et de l'UDP-glucose déshydrogénase d'*E. coli* K5. Cette souche recombinante produit entre 2 et 3,8 g/L d'acide hyaluronique en bioréacteur (Mao et al., 2009). Le même clonage a été effectué chez *Agrobacterium* sp. ATCC 31749 ; la production a atteint 0,3 g/L d'acide hyaluronique en erlenmeyer (Mao & Chen, 2007).

Chez *L. lactis*, le clonage des gènes *hasC* (pyrophosphorylase), *hasA* (acide hyaluronique synthase) et *hasB* (UDP-glucose déshydrogénase) de *S. zooepidemicus* (Figure 5) permet d'obtenir 1,8 g/L d'acide hyaluronique en fermenteur (Prasad, Jayaraman, & Ramachandran, 2010).

Chez *B. subtilis*, le clonage du gène *hasA* (acide hyaluronique synthase) de *S. zooepidemicus* et d'un second exemplaire du gène *tauD* (impliqué dans la formation d'UDP-acide glucuronique

chez *B. subtilis*) est suffisant pour obtenir une production importante d'acide hyaluronique (Widner et al., 2005) Le clonage d'un troisième gène, en plus de *hasA* et *tauD*, le gène *VHb* (*Vitreoscilla hemoglobin*), qui permet de reconstituer une partie de l'énergie consommée par la synthèse de l'acide hyaluronique, permet d'obtenir 1,8 g/L d'acide hyaluronique (L. J. Chien & C. K. Lee, 2007). En effet, la biosynthèse d'acide hyaluronique présente un coût énergétique important pour la cellule, pour la formation d'une mole d'acide hyaluronique, 3 moles d'ATP et 2 moles d'UTP sont nécessaires (Widner et al., 2005). Or, il a été montré chez *E. coli* cultivée dans un milieu limité en oxygène, que la présence de *VHb* permettait d'augmenter la production d'ATP au sein de la cellule (Kallio, Kim, Tsai, & Bailey, 1994). Cette propriété a donc été utilisée pour augmenter la quantité d'ATP disponible pour la synthèse de l'acide hyaluronique.

Les rendements de production des souches recombinantes sont tous inférieurs à celui de *S. zooepidemicus*. Cependant, la production d'acide hyaluronique par *B. subtilis* est actuellement privilégiée, car cet organisme ne produit pas d'endotoxines ni d'exotoxines (Liu, Liu, Li, G. Du, & Chen, 2011).

E. coli K4 est une bactérie pathogène responsable d'infection urinaire, elle présente différents facteurs de virulence (Cress et al., 2014; Wiles et al., 2008). La souche *E. coli* BL21 Star™(DE3), souche non pathogène ayant déjà été utilisée avec succès pour la production recombinante d'héparosane (Zhang et al., 2012), a été envisagée pour la production recombinante de chondroïtine (He et al., 2015) . Les gènes *kfoA*, *kfoF* et *kfoC* d' *E. coli* K4 (Figure 6) ont été clonés en conformation pseudo-opéron chez *E. coli* BL21 Star™(DE3) par le biais du vecteur pETM6. Dans le cas du pseudo-opéron, chaque gène est placé devant un promoteur, mais tous les gènes assemblés dépendent du même terminateur. Ainsi, plus un gène sera proche de ce dernier, plus il sera transcrit (conf. Chapitre 4, B). La souche ayant incorporé le vecteur pETM6-pCAF, qui permet le plus haut niveau d'expression du gène *kfoF* et le plus bas du gène *kfoC*, a permis d'obtenir le meilleur rendement de chondroïtine chez *E. coli* BL21 Star™ (DE3), soit 1,9 g/L dans un fermenteur (He et al., 2015).

Récemment, la production d'héparosane et de chondroïtine a été établie chez *B. subtilis* (Jin et al., 2016). Le clonage des gènes *kfoA* et *kfoC* d'*E. coli* K4, et des gènes *kfiA* et *kfiC* d'*E. coli* K5, a permis d'obtenir deux souches recombinantes produisant respectivement 5,22 g/L de chondroïtine et 5,82 g/L d'héparosane (Jin et al., 2016).

D. L'EPS HE800 produit par *V. diabolicus*

La bactérie *V. diabolicus* a été isolée des téguments dorsaux d'*Alvinella pompejana*, organisme prélevé au niveau d'une source hydrothermale, à 2600 m de profondeur (Raguene et al., 1997). En présence de glucose, cette bactérie synthétise un exopolysaccharide composé d'acide glucuronique et d'hexosamines, d'environ 8.10^5 g/mol (Rougeaux et al., 1999b). L'unité répétitive de cet EPS est composée de deux acides glucuroniques, d'une *N*-Acétylglucosamine et d'une *N*-Acétylgalactosamine (Figure 9) (Rougeaux et al., 1999b).

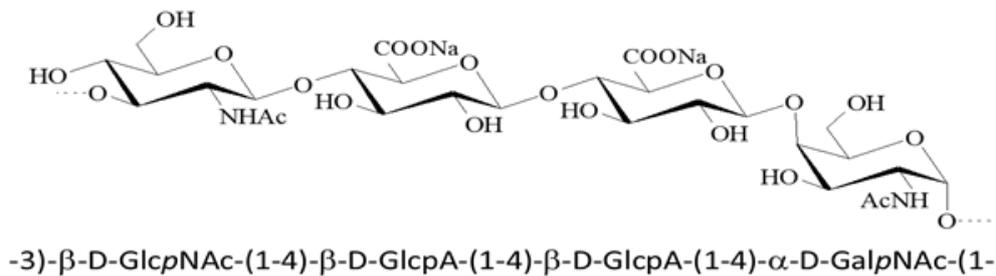


Figure 9 : Structure de l'unité répétitive de l'EPS HE800.

L'EPS de *V. diabolicus* présente une homologie structurale avec l'acide hyaluronique, il a déjà démontré des propriétés cicatrisantes, après avoir été utilisé comme implant de comblement osseux chez le rat (Zanchetta et al., 2003b). De plus, l'incorporation des EPS de *V. diabolicus* et d'*Alteromonas infernus* dans un hydrogel injectable permet d'accroître la viabilité et la prolifération cellulaire (Rederstorff et al., 2011).

Le rendement de la culture en fermenteur de *V. diabolicus*, à partir de glucose, est d'environ 1, 2 g/L (Goudenege et al., 2014) (Rougeaux et al., 1999b).

Le locus responsable de la synthèse de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus* a été identifié préalablement par bioinformatique, puis vérifié par mutagenèse dirigée (Goudenege et al., 2014). Ce locus d'environ 19 kb comporte 16 gènes codant pour différentes protéines, parmi lesquelles une priming glycosyl transférase (SypR), cinq glycosyltransférases de la famille 4 (SypH,I,J,N et P) et une de la famille 2 (SypQ) (Figure 10).

Compte-tenu de la structure de l'EPS HE800, et du nombre de glycosyltransférases codées par le cluster, il a été suggéré que seules SypR, SypQ et SypP étaient nécessaires à la formation de l'unité répétitive, les autres glycosyltransférases permettraient une variabilité de la structure de l'EPS, en fonction des conditions de culture (Goudenege et al., 2014).

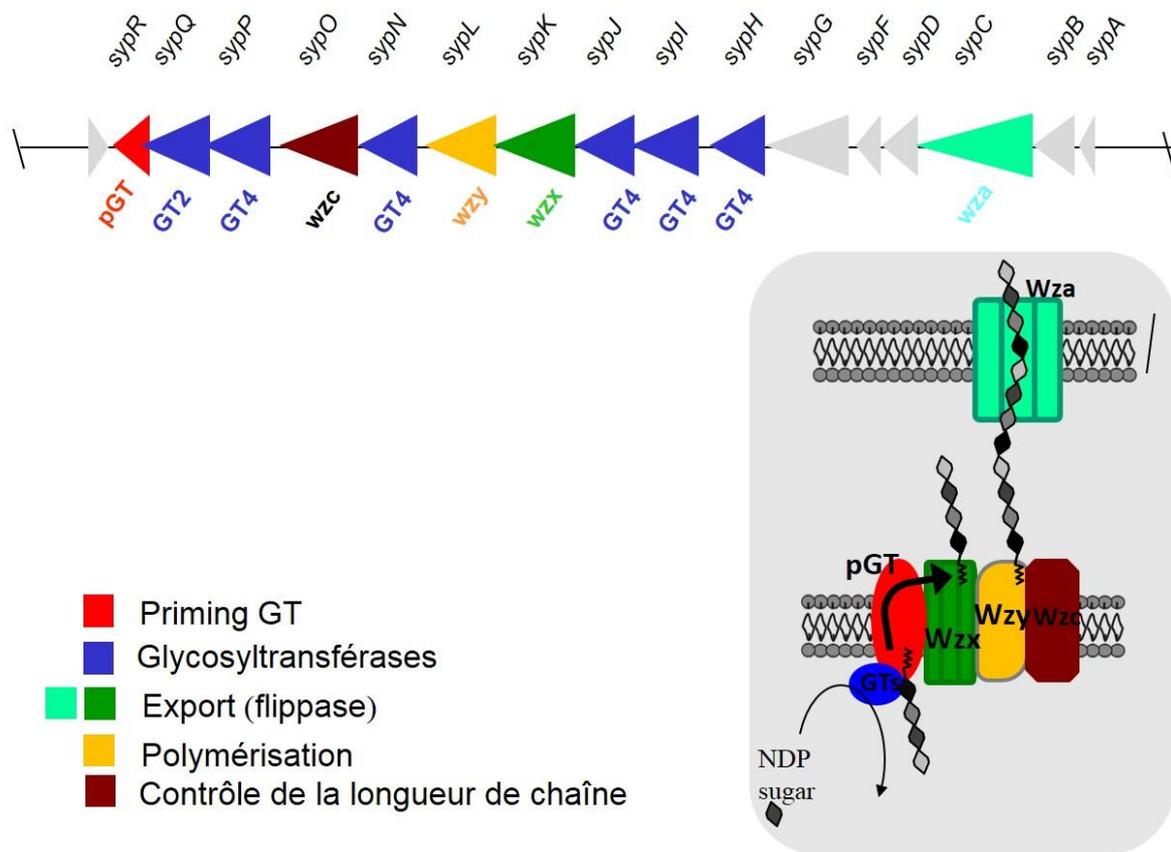


Figure 10 : Structure du cluster génétique responsable de la biosynthèse de l'EPS HE800 et protéines codées. La phospho-glycosyltransférase (pGT) greffe le premier monosaccharide sur l'accepteur membranaire lipidique, les glycosyltransférases greffent ensuite les sucres activés (UDP-sucres) sur l'unité répétitive en formation, la polymérisation et l'export sont assurés par Wzx, Wzy et Wza.

Les gènes codant pour la protéine périplasmique d'export Wza, l'oligosaccharide translocase Wzx, la polymérase Wzy, et le potentiel régulateur de la longueur de chaîne d'EPS Wzc, sont associés à la polymérisation et l'export de l'EPS HE800 (Goudenege et al., 2014; Whitfield, 2006).

La délétion du gène *sypK*, responsable de la synthèse de l'oligosaccharide translocase Wzx, entraîne une suppression de la synthèse d'EPS HE800 dans le milieu extracellulaire, tandis qu'une complémentation réalisée avec ce gène la rétablit (Goudenege et al., 2014). Cette expérience a permis d'attribuer la synthèse de l'EPS HE800 à ce cluster de gènes.

Le cluster HE800 présente une homologie avec le cluster *syp* de *V. fischeri* (Yildiz & Visick, 2009; Yip, Grublesky, Hussa, & Visick, 2005). Le cluster *syp* est responsable de l'établissement d'un biofilm permettant la colonisation du calmar *Euprymna scolopes* par *V. fischeri*, les deux organismes vivant en symbiose (Morris & Visick, 2010; Yip et al., 2005).

Les deux clusters comportent tous deux le gène *sypA*, qui code pour un facteur antagoniste anti-sigma, et qui, chez *V. fischeri* est un régulateur de la formation du biofilm ; la délétion de *sypA* inhibe en effet la formation du biofilm et donc la colonisation de l'hôte (Morris, Darnell, & Visick, 2011).

La protéine SypB pourrait se lier aux peptidoglycanes, et la protéine SypD a été associée à la régulation d'élongation de la chaîne, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés (Shibata et al., 2012).

Le gène *sypF*, tronqué chez *V. diabolicus*, code pour une protéine régulatrice capable de phosphoryler SypE et SypG, afin de respectivement inhiber ou stimuler la formation de biofilm chez *V. fischeri* (Norsworthy & Visick, 2015; Yip et al., 2005).

Le gène *sypG* code pour un régulateur de réponse. Chez *V. fischeri*, l'expression du cluster *syp* est régulée par un système de transduction du signal à deux composants, au sein duquel RscS est le senseur kinase, qui réagit à un signal spécifique (état de la cellule), et SypG est le régulateur de réponse qui régule la transcription du cluster *syp* selon l'état de RscS (Norsworthy & Visick, 2015; Yip, Geszvain, DeLoney-Marino, & Visick, 2006).

Les locus de *V. diabolicus* et *V. fischeri* présentent différentes variations. Chez *V. diabolicus*, en comparaison avec *V. fischeri*, le gène *sypF* est tronqué, tandis que les gènes *sypM* et *sypE* sont absents (Goudenege et al., 2014). Le gène *sypM* est responsable d'une O-Acétyletransférase (Shibata et al., 2012), *sypE* code pour un régulateur de réponse qui cause l'inhibition de la formation du biofilm, chez *V. fischeri*, en cas de surexpression de SypG (Morris & Visick, 2013). Le gène *sypF* est lui aussi impliqué dans la formation du biofilm chez *V. fischeri* (Visick, 2009). Compte-tenu de ces différences, il est probable que les deux clusters ne soient pas régulés de manière identique.

E. Stratégies autour du cluster HE800

Cette partie rassemble différentes données bibliographiques, nécessaires à l'élaboration d'expériences des chapitres 3 (F) et 4 (A).

1. Mise en évidence du rôle de SypG dans la régulation du cluster HE800

a) Rôle du régulateur SypG

Chez *V. fischeri*, le cluster *syp* est responsable de la production d'un biofilm permettant aux bactéries de coloniser leur hôte, le calmar *Euprymna scolopes* (Morris & Visick, 2010; Yip et al., 2005). Si la bactérie *V. diabolicus* a bien été isolée des téguments dorsaux d'*Alvinella pompejana*, une relation de symbiose ou la production d'un biofilm n'a pas été mise en évidence chez cet organisme (Goudenege et al., 2014; Rougeaux et al., 1999b).

Le cluster de *V. fischeri* comporte 18 gènes. Sur ce cluster, 4 promoteurs de type sigma 54 ont été identifiés en amont des gènes *sypA*, *sypI*, *sypM* et *sypP* (Yip et al., 2005). Ce type de promoteur sigma 54 requiert la présence d'une protéine activatrice au cours de la transcription, le plus souvent un régulateur de réponse (Shingler, 2011). L'analyse du cluster HE800 a mis en évidence la présence de SypG, un régulateur de réponse hautement conservé chez quatre autres organismes, *V. fischeri*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae* (Yip et al., 2005). Différents mutants de *V. fischeri*, ainsi que la souche sauvage ont été transformés avec un plasmide multicopie portant *sypG*, leur capacité à former un biofilm en condition statique en a été multipliée par 3,5 fois, à l'exception du mutant *sypC* (Yip et al., 2005).

b) Régulation du cluster de biosynthèse chez *V. fischeri* et *V. vulnificus*

L'analyse du cluster *syp* chez *V. fischeri* a révélé la présence d'une séquence conservée de 22 pb, ou motif G, située en amont (50 à 90 pb) de chacun des promoteurs de type sigma 54 (Yip et al., 2005) (Figure 11 A). Ces séquences sont reconnues par SypG, leur présence est nécessaire à l'établissement du biofilm (validation par délétion de ces séquences) (Ray, Eddy, Husa, Misale, & Visick, 2013). Chez *V. fischeri*, l'expression du cluster *syp* est régulée par un système de transduction du signal à deux composants, au sein duquel RscS est le senseur kinase, qui réagit à un signal spécifique (état de la cellule), et *sypG* est le régulateur de réponse qui régule la transcription du cluster *syp* selon l'état de RscS (Yip et al., 2006). Chez *V. vulnificus*, la transcription du cluster est activée par SmcR, un régulateur lié au quorum sensing, SmcR se fixe à un site localisé en amont du site d'initiation de la transcription du cluster (146-125 pb) (Lee, Kim, Hwang, Park, & Lee, 2013) (Figure 11 B).

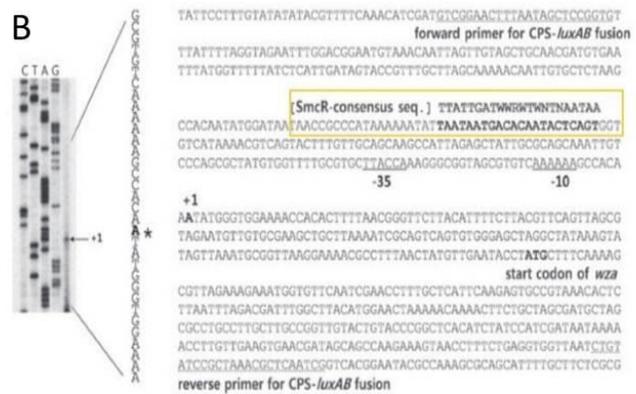
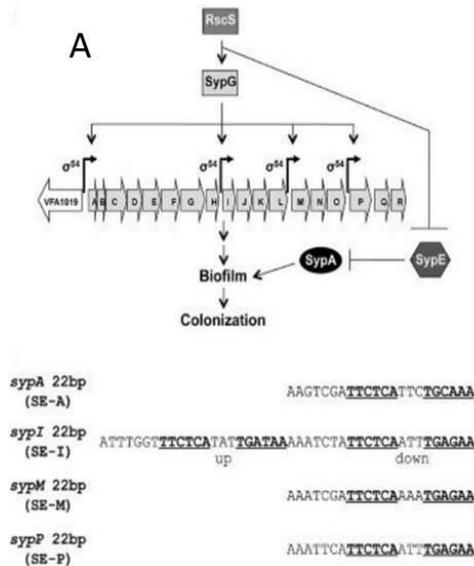


Fig. 8. Identification of the transcription initiation site for the CPS gene cluster. A. A primer extension experiment performed with *V. vulnificus* RNA. Lanes C, T, A and G represent the nucleotide sequencing ladders of the pCB014. An arrow with +1 indicates the transcription initiation site (TIS) for the CPS gene cluster. An asterisk indicates the TIS nucleotide upstream of *wza*, the first gene in the CPS gene cluster. B. Nucleotide sequences of the upstream region of *wza*. The start codon for *wza*, promoter (−10 and −35 regions), and TIS are designated by an arrow, +1 and underlines respectively. The sequences for forward and reverse primers used to construct a *luxAB*-transcription reporter fusion (pCB014; Kim et al., 2009) are underlined with dashes. The nucleotides bound by SmcR (shown in Fig. 10) are bold-faced and aligned with the SmcR-binding consensus sequence proposed by Lee et al. (2008).

Figure 11 : Motifs identifiés chez *V. fischeri* pour la fixation de SypG, d'après Ray *et. al* (A) (V. A. Ray et al., 2013). Motifs identifiés chez *V. vulnificus*, d'après Lee et col. (B) (Lee et al., 2013).

2. Amélioration de la production de polysaccharides par ingénierie des voies de biosynthèses de leurs précurseurs.

L'une des clés pour établir une production recombinante d'EPS, ou améliorer son rendement, est d'augmenter la disponibilité des précurseurs sucres de l'EPS chez la souche recombinante. Cette opération peut être réalisée par ingénierie génétique, l'optimisation de la production de l'acide hyaluronique et de l'héparosane dans ce cadre a été étudiée.

a) Cas de l'acide hyaluronique

La production d'acide hyaluronique a fait l'objet de différentes modifications par ingénierie génétique afin d'améliorer sa production chez différents organismes.

Chez *L. lactis*, la surexpression (promoteur inductible) de l'acide hyaluronique synthase (assemblage des sous-unités) par rapport à la déshydrogénase (formation d'UDP-acide glucuronique) entraîne une diminution du poids moléculaire de l'acide hyaluronique (Figure 12)(Liu et al., 2011), en revanche, l'ajout d'une copie du gène de l'UDP glucose pyrophosphorylase (pour la synthèse d'UDP-*N*-Acétylglucosamine) et du gène de la déshydrogénase (synthèse d'UDP-acide glucuronique) entraîne une augmentation de sa production (Figure 13)(Prasad et al., 2010).

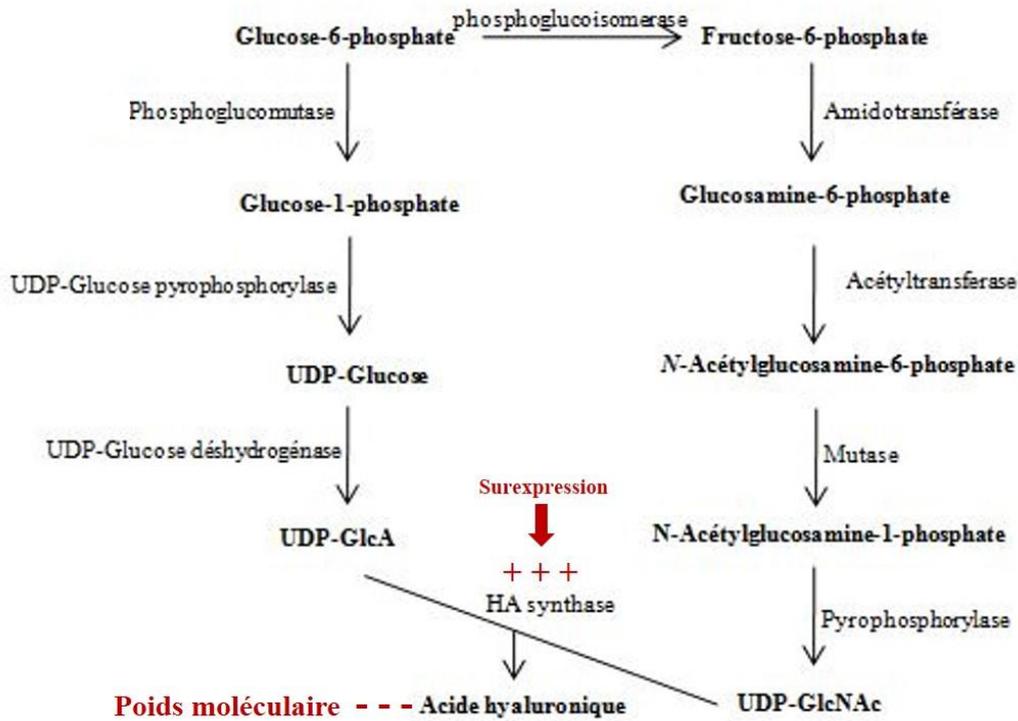


Figure 12 : Production d'acide hyaluronique chez *L. lactis* d'après Liu et col. (Liu et al., 2011).

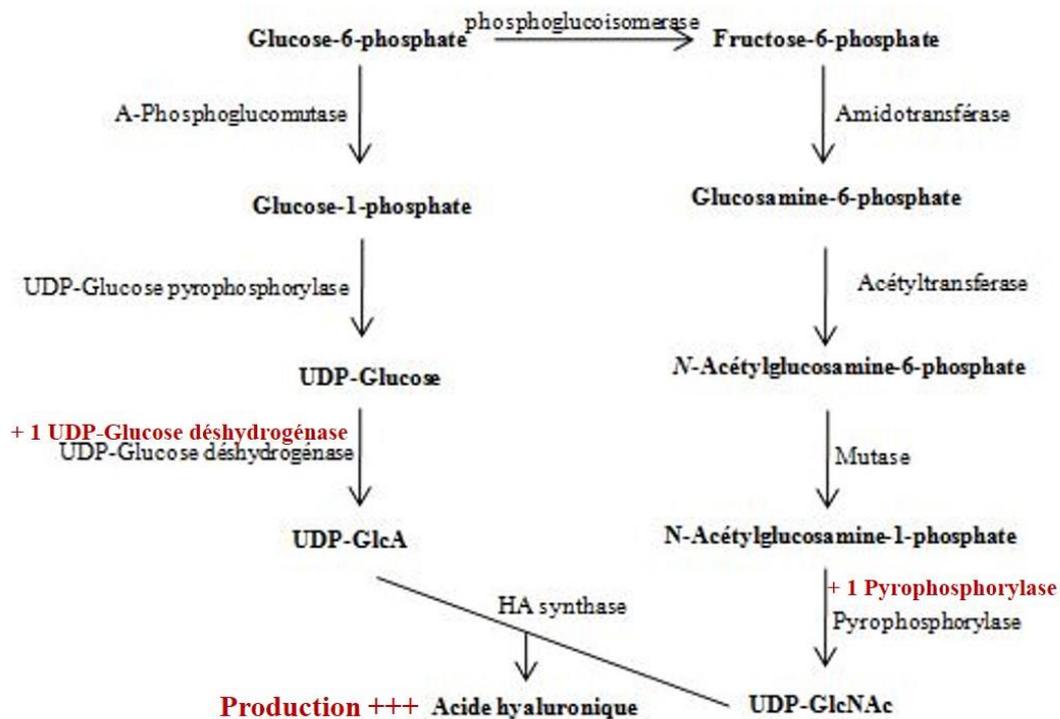


Figure 13 : Production d'acide hyaluronique chez *L. lactis* d'après Prasad et col. (Prasad et al., 2010).

Chez *Streptococcus zooepidemicus*, la surexpression des gènes responsables de la synthèse d'UDP-acide glucuronique ou d'UDP-*N*-Acétylglucosamine entraîne respectivement une diminution (Figure 14) et une augmentation (Figure 15) du poids moléculaire de l'acide hyaluronique (Chen, Marcellin, Hung, & Nielsen, 2009).

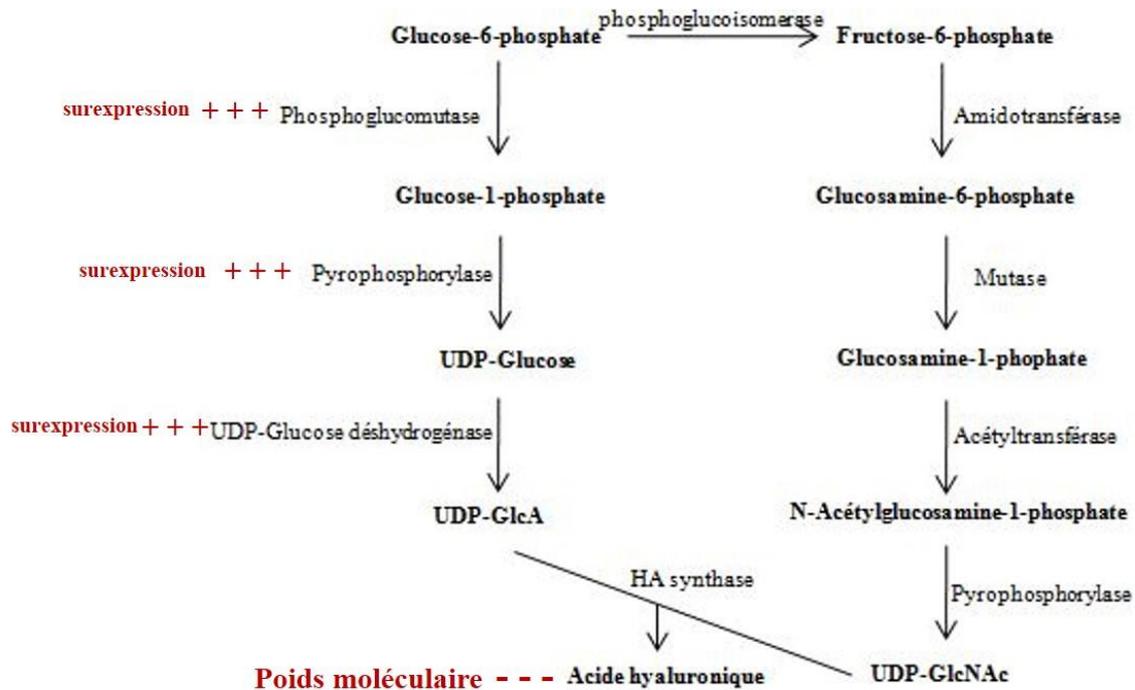


Figure 14 : Production d'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*, surexpression des gènes responsables de la synthèse d'UDP-acide glucuronique, d'après Chen et col. (Chen et al., 2009).

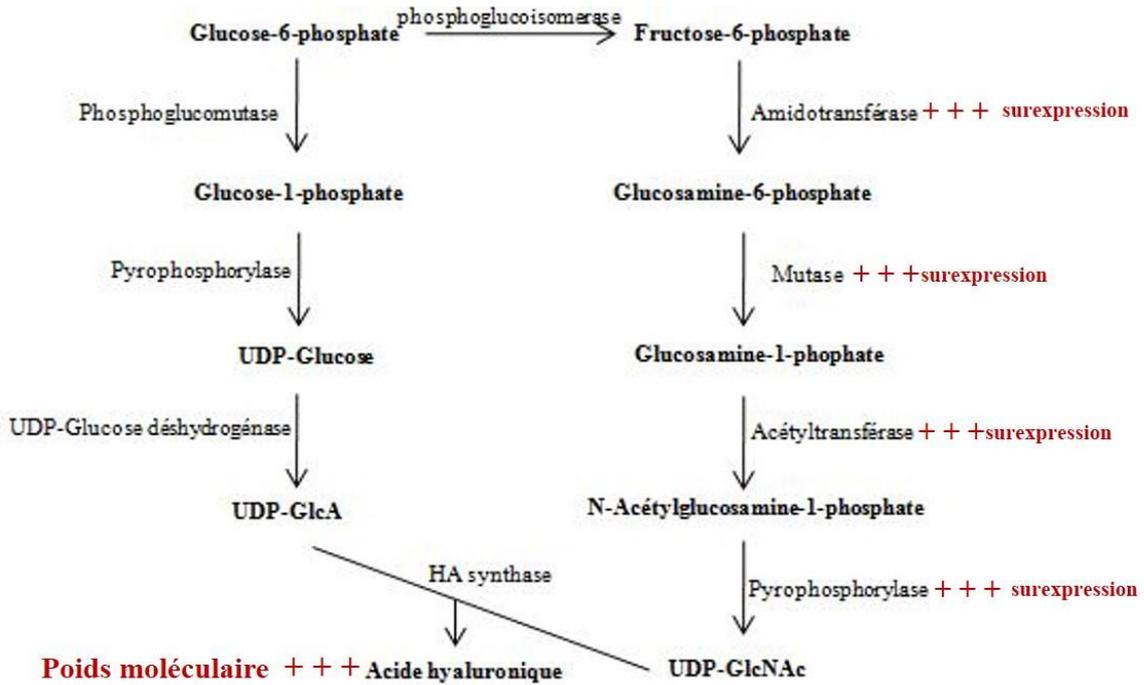


Figure 15 : Production d'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*, surexpression des gènes responsables de la synthèse d'UDP-*N*-Acétyleglucosamine, d'après Chen et col. (Chen et al., 2009).

Chez *E. coli*, l'ajout d'une copie du gène de la déshydrogénase (en plus d'une copie de l'acide hyaluronique synthase) est nécessaire à la synthèse d'acide hyaluronique (Figure 16) (Mao et al., 2009), en effet, certaines souches d'*E. coli* non pathogènes ont une très faible activité de cette déshydrogénase.

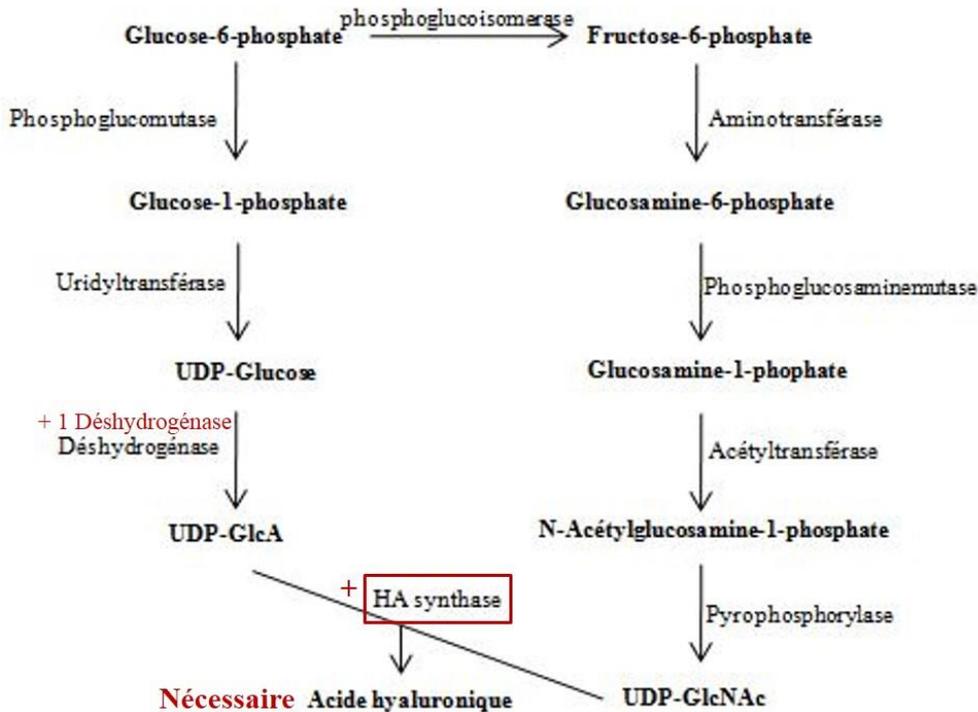


Figure 16 : Production d'acide hyaluronique chez *E. coli*, d'après Mao et col. (Mao et al., 2009).

b) Cas de l'héparosane

L'héparosane est un précurseur de l'héparine, il est composé d'acide glucuronique et de *N*-Acétyleglucosamine.

Chez *E. coli* K5, la surexpression de la déshydrogénase entraîne une diminution de la production d'héparosane (Figure 17) (Roman et al., 2003), en revanche, l'ajout d'une copie de ce même gène entraîne le doublement du rendement de production (Figure 18) (Zhang et al., 2012).

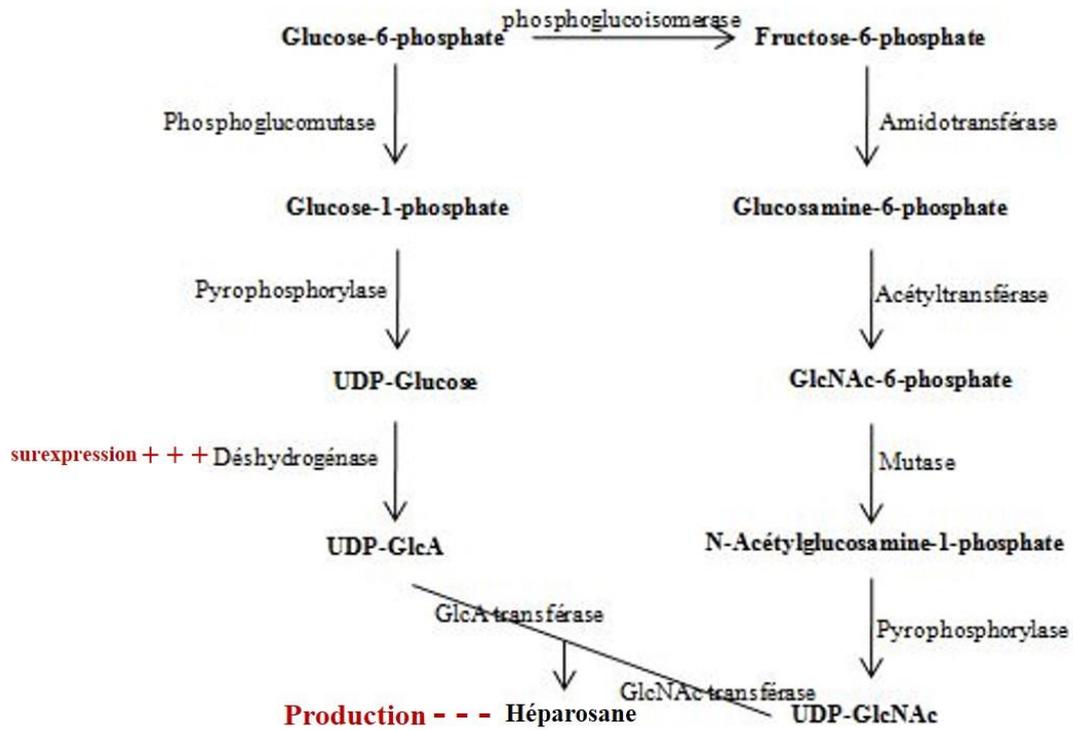


Figure 17 : Production d'héparosane chez *E. coli*, d'après Roman et col. (Roman et al., 2003).

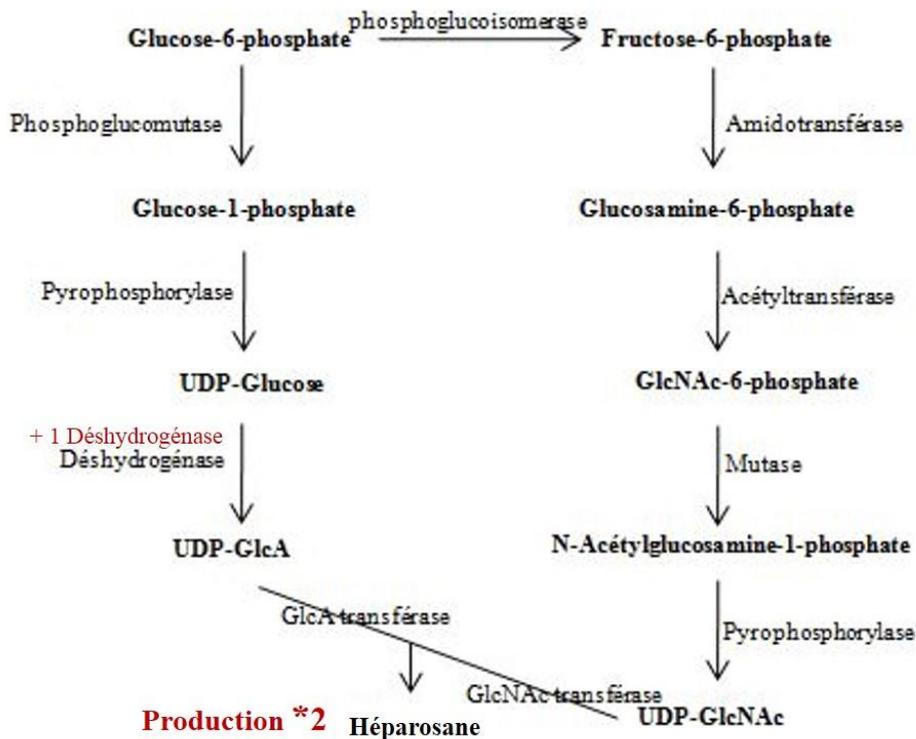


Figure 18 : Production d'héparosane chez *E. coli*, d'après Zhang et col. (Zhang et al., 2012).

D'après les modèles étudiés, la duplication (clonage) d'un ou plusieurs gènes impliqué(s) dans les voies métaboliques d'intérêt semble plus efficace que leur surexpression (promoteur inductible).

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

I. Matériels biologiques

A. Souches bactériennes

Les souches utilisées et créées lors de ce travail sont présentées dans le tableau II. Afin de les conserver, chacune a été cultivée en milieu approprié avant d'être congelée à -80°C dans 20 % de glycérol (v/v).

Tableau II : Souches bactériennes utilisées

Souches	Croissance	Plasmide	Collection - Description	Référence
<i>Vibrio diabolicus</i>	Zobell, 28°C, 32°C et 37°C	-	CNCM I-1629	(G. Raguenes et al., 1997)
<i>Vibrio diabolicus</i> GV723	Zobell, Cm 5 µg/mL	pMRB-sypG	Expression constitutive de SypG	F. Le Roux (2013), Boursicot (2012)
<i>E. coli</i> EPI100™	LB, 37°C	-	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 λ ⁻ rpsL (Str ^R) nupG trfA dhfr	Epicentre
<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 2	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL	pCC1FOS-LP2 _{HE800}	Cluster HE800 (2) cloné dans un fosmide	Cette étude
<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 49	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL	pCC1FOS-LP49 _{HE800}	Cluster HE800 (49) cloné dans un fosmide	Cette étude
<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 59	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL	pCC1FOS-LP59 _{HE800}	Cluster HE800 (59) cloné dans un fosmide	Cette étude
<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 78	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL	pCC1FOS-LP78 _{HE800}	Cluster HE800 (78) cloné dans un fosmide	Cette étude
<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 92	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL	pCC1FOS-LP92 _{HE800}	Cluster HE800 (92) cloné dans un fosmide	Cette étude
<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 92-KfiD	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL Tétracycline 15 µg/mL	pBBR-KfiD	<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 92 + plasmide pBBR-KfiD contenant le gène <i>KfiD</i> codant la déshydrogénase d' <i>E. coli</i> K5	Cette étude
<i>E. coli</i> EPI100™ clone 92-KfiD-wbpP	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL Tétracycline 15 µg/mL Kanamycine 40 µg/mL	pBBR-KfiD, pWKS-wbpP	<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 92-KfiD + plasmide pWKS-wbpP contenant le gène <i>wbpP</i> codant l'épimérase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cette étude

<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 92sypG	LB, 37°C Chloramphénicol 12, 5 µg/mL Kanamycine 50 µg/mL	pSF-OXB18- sypG	<i>E. coli</i> EPI100™ Clone 92 + plasmide pSF-OXB18- <i>sypG</i> , comportant un promoteur fort d'expression constitutive chez <i>E. coli</i> , et un exemplaire de <i>sypG</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- sypG	LB, 37°C Kanamycine 50 µg/mL	pET-SUMO- sypG	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + plasmide pET- SUMO contenant le gène <i>sypG</i>	Cette étude
Mach1™-T1R	LB, 37°C		<i>E. coli</i> str. W F ⁻ Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK ⁻ , mK ⁺) ΔrecA1398 endA1 tonA	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	LB, 37°C		<i>E. coli</i> str. B F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5- T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺] _K - 12(λ ^S)	Invitrogen
<i>E. coli</i> JM109	LB, 37°C		endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ(lac-proAB) e14- [P' traD36 proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-R	LB, 37°C Kanamycine 50 µg/mL	pET-SUMO-R	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + plasmide pET- SUMO contenant le gène <i>sypR</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- RQP	LB, 37°C Kanamycine 50 µg/mL	pET-SUMO- RQP	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + plasmide pET- SUMO contenant les gènes <i>sypR</i> , <i>sypQ</i> et <i>sypP</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- RQPON	LB, 37°C Kanamycine 50 µg/mL	pET-SUMO- RQPON	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + plasmide pET- SUMO contenant les gènes <i>sypR</i> , <i>sypQ</i> , <i>sypP</i> , <i>sypO</i> et <i>sypN</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> BL21(DE3)- RK	LB, 37°C Kanamycine 50 µg/mL	pET-SUMO-RK	<i>E. coli</i> BL21(DE3) + plasmide pET- SUMO contenant les gènes <i>sypR</i> , <i>sypQ</i> , <i>sypP</i> , <i>sypO</i> , <i>sypN</i> , <i>sypL</i> et <i>sypK</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> JM109- R	LB, 37°C Ampicilline 80 µg/mL	pETM6-R	<i>E. coli</i> JM109-R + plasmide pETM6 contenant le gène <i>sypR</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> JM109- Q	LB, 37°C Ampicilline 80 µg/mL	pETM6-Q	<i>E. coli</i> JM109-R + plasmide pETM6 contenant le gène <i>sypQ</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> JM109- L	LB, 37°C Ampicilline 80 µg/mL	pETM6-L	<i>E. coli</i> JM109-R + plasmide pETM6 contenant le gène <i>sypL</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> JM109- K	LB, 37°C Ampicilline 80 µg/mL	pETM6-K	<i>E. coli</i> JM109-R + plasmide pETM6 contenant le gène <i>sypK</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> JM109- C	LB, 37°C Ampicilline 80 µg/mL	pETM6-C	<i>E. coli</i> JM109-R + plasmide pETM6 contenant le gène <i>sypC</i>	Cette étude
<i>E. coli</i> JM109- P	LB, 37°C Streptomycine 50 µg/mL	pCDM4-P	<i>E. coli</i> JM109-R + plasmide pCDM4 contenant le gène <i>sypP</i>	Cette étude

B. Vecteurs

Les différents vecteurs utilisés lors de ce travail sont présentés dans le tableau III.

Tableau III : Vecteurs utilisés

Vecteur	Description	Source ou référence
pCC1FOS	[Cm ^R] linéarisé par Eco72 I361	Kit Epicentre CCFOS110
pBBR-KfiD	[Tet ^R], portant <i>kfiD</i> d' <i>E.coli</i> K5	Don de B. Priem
pWKS-wbpP	[Kan ^R], portant <i>wbpP</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Don de B. Priem
pSF-OXB18	[Kan ^R], promoteur fort chez <i>E.coli</i> , 600 copies par cellule	SIGMA
pET-SUMO	[Kan ^R], promoteur T7	Thermo Fisher Scientific
pETM6	[Sm ^R], promoteur T7, vecteur ePathBrick	Addgene (49795, Mattheos Koffas, Rensselaer Polytechnic Institute, NY USA)
pCDM4	[Amp ^R], promoteur T7, vecteur ePathBrick	Addgene (49796, Mattheos Koffas, Rensselaer Polytechnic Institute, NY USA)

II. Cultures

A. Milieux de culture

Milieu Zobell:

Produits	Concentration (g/L)
Sels d'aquarium (Instant Ocean)	33,33
Extrait de levure (Organotechnie)	1
Peptone (Organotechnie)	4

Milieu LB :

Produits	Concentration (g/L)
NaCl (Sigma-Aldrich)	5
Extrait de levure (Organotechnie)	5
Tryptone (Organotechnie)	10

Milieu R :

Produits	Concentration (g/L)
Glycérol	10 g L ⁻¹
Peptone de blé	1 g L ⁻¹

KH ₂ PO ₄	2 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	9,7 g L ⁻¹
Citrate de potassium	0,5 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g L ⁻¹
MgCl ₂	0,1 g L ⁻¹
MgSO ₄	10 mM

Antibiotiques (Stérilisation sur filtre 0,45 µm):

Ampicilline (80 µg/mL); Streptomycine (50 µg/mL) ; Chloramphenicol (5 µg/mL et 12,5 µg/mL) ; Kanamycine (40 µg/mL et 50 µg/mL) ; tétracycline (15 µg/mL).

Milieu ZPHUF:

Produits	Concentration (g/L)
Sels d'aquarium (Instant Ocean)	33,33
Extrait de levure (Organotechnie)	1
Peptone (Organotechnie)	4
HEPES	100 mM
PIPES	100 mM

Le milieu ZPHUF choisi est tamponné grâce à l'HEPES et le PIPES ; de plus l'extrait de levure ultrafiltré contient moins de sucres monomères que l'extrait de levure classique, ce qui limite l'induction d'EPS (important pour le témoin).

Les sucres utilisés pour compléter les milieux ont été dilués dans de l'eau à la concentration souhaitée, et stérilisés par filtration (sur filtre 0,45 µm). Des géloses ont été réalisées par l'addition de 15 g/L d'agar au milieu choisi.

B. Suivi de croissance

Les croissances bactériennes étaient suivies par mesure de l'absorbance à 600 nm sur un prélèvement en cuve (spectrophotomètre UV1800, Shimadzu) ou en microplaques (Genios +, Tecan). La turbidimétrie a aussi été suivie par mesure directement dans les tubes de culture (Turbidimètre 2100 AN, HACH).

III. Extraction et purification des EPS

Les cultures ont été centrifugées à 8000 g pendant 30 minutes à 10 °C (centrifugeuse Avanti, Beckman Coulter-). Le surnageant était généralement traité immédiatement, ou bien conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

A. Filtration et ultrafiltration

Le surnageant de culture a été filtré sur un filtre GF/D de 2,6 µm puis un filtre GF/F de 0,7 µm (Whatman) avant d'être ultrafiltré. Le principe de l'ultrafiltration repose sur la purification de l'échantillon par élimination de molécules d'une taille inférieure à celle correspondant au seuil de coupure choisi de la membrane. Les sels et les sucres monomères résiduels dans le milieu sont ainsi éliminés. L'ultrafiltration tangentielle a été réalisée avec une membrane de seuil de coupure de 100 kDa (OMEGA), montée sur un système Masterflex (Cole-Parmer). Cette technique permet de concentrer les molécules les plus grosses dans le rétentat. Lorsque la conductivité de l'échantillon ultrafiltré atteint 20 µS/cm, celui-ci est collecté dans un cristallisateur et congelé à -20°C avant d'être lyophilisé.

B. Lyophilisation

Au cours de cette étape, la température de l'échantillon congelé est légèrement augmentée, la vapeur d'eau engendrée est alors entraînée dans un piège à froid. Cette technique permet d'éliminer l'eau de l'échantillon, et de le sécher au bout d'environ deux jours de lyophilisation. Les lyophilisateurs FD4 (Heto) ou Pilote 1.5CCPS (Cryotec) ont été utilisés.

IV. Analyses chimiques et biochimiques

A. Analyse de la masse moléculaire

Un système de chromatographie liquide d'exclusion de taille haute performance (HPLC, Prominence Shimadzu) couplé à une détection de la diffusion dynamique multi-angle de la lumière (MALS, Dawn Heleos II, Wyatt Technology) ainsi qu'à un réfractomètre différentiel (Optilab Wyatt Technology Sc) a été utilisé pour caractériser la masse moléculaire des polymères. Cette méthode est basée sur l'étude de la diffusion de la lumière par l'échantillon,

et ne requiert pas de standards pour l'étalonnage. Dans un premier temps, les molécules sont séparées selon leur taille sur colonne de gamme de séparation 10^2 – 10^7 g/mol (Pl aquagel-OH mixed, 8 μ m, 300x7.5 mm, Varian). L'éluion a été réalisée à un débit de 1 mL/min de tampon acétate d'ammonium 0,1 M, contenant 0.03 % d'azide de sodium et préalablement filtré sur membrane (PVDF, 0,1 μ m). Les échantillons ont également été filtrés sur membrane (0,2 μ m) et 100 μ L (2 mg/mL) de chaque ont été injectés dans la colonne.

Chaque polysaccharide est caractérisé par un incrément de l'indice de réfraction spécifique (dn/dc). Les masses moléculaires absolues ont été déterminées grâce au logiciel Astra 6.1. La masse moléculaire a été calculée en utilisant $dn/dc = 0.145$ mL/g

B. Analyses colorimétriques

1. Analyse des oses neutres

La teneur en oses neutres des échantillons a été mesurée selon la méthode à l'orcinol sulfurique de Tillmans et Philippi (Tillmans & Philippi, 1929) modifiée par Rimington (Rimington, 1931). Les liaisons osidiques du polysaccharide sont hydrolysées par l'acide sulfurique, les monosaccharides libérés et déshydratés forment des dérivés furfural. Ces dérivés, en présence d'orcinol, produisent des chromophores détectables à 510 nm.

L'échantillon est préalablement dilué dans de l'eau milli-Q à la teneur de 1 mg/mL. Pour chaque échantillon, 100 et 200 μ L de solution ont été placés dans des tubes de verre. Au besoin, leur volume a été complété à 200 μ L avec de l'eau milli-Q. Dans la glace, à chaque tube ont été ajoutés 400 μ L d'une solution d'orcinol à 15 g/L dans l'acide sulfurique, ainsi que 3 mL d'acide sulfurique à 60 % (v/v). Les tubes ont été recouverts d'une feuille d'aluminium, et incubés au bain-marie à 80°C pendant 20 minutes. Après un refroidissement rapide, ils ont été placés à l'obscurité pendant 45 minutes. En parallèle, deux gammes étalon ont été réalisées à l'aide de solutions de glucose et d'acide glucuronique, et soumises aux mêmes conditions. L'absorbance de chaque solution a ensuite été relevée à 510 nm.

2. Analyse des acides uroniques

La méthode de Blumenkrantz et Asboe-Hansen (Blumenkrantz & Asboe-Hansen, 1973) modifiée par Filisetti-Cozzi et Carpita (Filisetticozzi & Carpita, 1991), a été utilisée pour doser les acides uroniques.

Les liaisons osidiques du polysaccharide sont hydrolysées par l'acide sulfurique. En présence de 3-hydroxydiphényl (MHDP), les acides uroniques produisent une coloration rose, intensifiée par l'ajout de borate et détectable à 525 nm.

Des volumes de 50, 100 et 200 µL de chaque échantillon dilué à 2 mg/mL ont été déposés dans des tubes de verre. Au besoin, les volumes ont été ajustés à 400 µL à l'aide d'eau désionisée. A chaque tube ont été ajoutés 40 µL d'une solution de sulfamate (acide sulfamique/potassium sulfamate 4 M pH 1,6) et 2,4 mL d'une solution de tétraborate de sodium (75 mM dans l'acide sulfurique). En parallèle, deux gammes étalon ont été réalisées à l'aide de solutions de glucose et d'acide glucuronique. Les tubes ont été recouverts d'une feuille d'aluminium, et incubés au bain-marie à 80°C pendant 20 minutes avant d'être placés dans la glace. A chaque tube ont été ajoutés 80 µL d'une solution de MHDP (0,15 % m/v) dans NaOH 0.5%. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 20 minutes, avant une lecture de l'absorbance à 525 nm.

3. Calcul des pourcentages massiques en oses neutres et oses acides

La présence d'acides uroniques interfère dans le dosage des oses neutres (méthode à l'orcinol sulfurique)(Montreuil & J, 1963). Une formule correctrice a donc été utilisée afin de calculer les concentrations relatives en oses neutres et en acides uroniques :

$$\alpha = \text{Glu} \times \left(\frac{a}{200}\right) + \text{GluA} \times \left(\frac{b}{200}\right)$$

$$\beta = \text{Glu} \times \left(\frac{d}{200}\right) + \text{GluA} \times \left(\frac{c}{50}\right)$$

Dans cette formule de la correction de la masse d'acides uroniques et d'oses neutres, α est l'absorbance des solutions dosées à l'orcinol sulfurique ; β est l'absorbance des solutions dosées au MHDP ; **a** est l'absorbance de 200 µg de solution standard de D-glucose dosée à l'orcinol sulfurique ; **b** est l'absorbance de 200 µg de solution standard d'acide D-glucuronique dosée à l'orcinol sulfurique ; **c** est l'absorbance de 50 µg de solution standard d'acide D-glucuronique dosée au MHDP ; **d** est l'absorbance de 200 µg de solution standard de D-glucose dosée au MHDP.

4. Analyse des protéines

Les protéines ont été dosées à l'aide de la méthode à l'acide Bicinchoninique (BCA) (Sigma). En milieu alcalin, les ions cuivriques Cu^{2+} sont réduits par les protéines en ions cuivreux Cu^+ . Les ions cuivreux forment alors un complexe coloré en pourpre avec le BCA.

Le réactif au cuivre a été préparé extemporanément en ajoutant 1 mL de réactif CuSO_4 (4% m/v) à 50 mL de réactif BCA (1 mg/mL final). Dans chaque tube en verre ont été ajoutés 100 μL d'échantillon et 2 mL du réactif. Pour chaque échantillon (2 mg/mL), deux dilutions (10^{-2} et 10^{-4}) ont été analysées. En parallèle, une gamme étalon de 0 à 0,5 mg/mL d'albumine de sérum bovin (BSA) a été réalisée et traitée dans les mêmes conditions. Après homogénéisation, l'ensemble a été placé au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. Les tubes ont été refroidis dans l'eau rapidement et les absorbances des solutions à 562 nm ont ensuite été déterminées.

C. Composition osidique par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Chaque échantillon d'EPS a été soumis à une méthanolyse, afin d'isoler tous les monosaccharides qui le composent. Les résidus glycosidiques sous forme de méthylglycosides O-triméthylsilylés et N-acétylés obtenus ont ensuite été identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse.

Dans chaque tube en verre ont été placés 400 μg d'échantillon, 20 μg de myo-inositol servant de référence interne et 500 μL de méthanol/acide chlorhydrique 3 M (Supelco). L'ensemble a ensuite été incubé à 100°C pendant 4 heures dans un bain à sec. Après refroidissement à température ambiante, du carbonate d'argent a été ajouté à chaque tube, afin de neutraliser le méthanolysat. Le pH des solutions a été contrôlé avec du papier pH. Dans le but d'acétyler les osamines, 50 μL d'anhydride acétique ont été ajoutés. L'ensemble a ensuite été incubé à température ambiante et à l'obscurité pendant une nuit. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 3000 g à température ambiante pendant 15 minutes. Les surnageants ont été placés dans de nouveaux tubes avant d'être évaporés sous jet d'azote. A chaque tube ont été rajoutés 50 μL de pyridine et 50 μL de sylon (BSTFA : TMCS, 99:1, Supelco). Une homogénéisation a été réalisée après chaque ajout. L'ensemble a ensuite été incubé à température ambiante pendant 2h30, avant d'être évaporés sous jet d'azote. Les méthylglycosides triméthylsilylés ont ensuite été repris dans 500 μL de dichlorométhane, concentrés sous jet d'azote et à nouveau repris dans 500 μL de dichlorométhane (la pyridine résiduelle est ainsi mieux éliminée). Les échantillons ont été filtrés (0,45 μm) avant d'être transférés dans un vial de GC pour être injectés dans la colonne.

L'injection a été réalisée sur un chromatographe HP-5890 (Hewlett-Packard) équipé d'un passeur automatique, d'un injecteur « on-column », d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire apolaire en silice fondue CP-Sil-5CB (Chrompack). L'hélium a été

utilisé comme gaz vecteur, la température du détecteur était de 300°C. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel Agilent Chemstation.

Les échantillons injectés dans la colonne sont soumis à un cycle thermique composé d'une minute à 50°C, d'un gradient de 20°C/minute jusqu'à 120°C, d'un gradient de 2°C/minute jusqu'à 240°C, d'un gradient de 10°C/minute jusqu'à 280°C, suivi de 10 minutes à 280°C.

Chaque monosaccharide présente un profil d'élution spécifique, des étalonnages de la colonne sont réalisés régulièrement avec des standards. Les chromatogrammes obtenus sont comparés à ceux des standards pour identification des pics.

Le ratio des monosaccharides présents au sein des échantillons a été déterminé selon la méthode de Kamerling (Kamerling, Gerwig, Vliegthart, & Clamp, 1975) modifiée par Montreuil (Montreuil, 1986), d'après les formules suivantes :

20 µg de myo – inositol présente une aire de A

$$\frac{20}{A} \times \text{Aire globale du standard} = \text{quantité de standard } (\mu\text{g})$$

$$\frac{\text{quantité de standard } (\mu\text{g})}{\text{coef. réponse du standard}} = \text{quantité corrigée du standard } (\mu\text{g})$$

$$\frac{\text{quantité corrigée de standard } (\mu\text{g})}{400 (\mu\text{g}) \text{ d'échantillon}} \times 100 = \% \text{ du standard dans l'échantillon}$$

D. Analyses par électrophorèses

1. Electrophorèse en gel d'acrylamide (PAGE)

L'électrophorèse a été réalisée sur un système Mini Protean III (Biorad) à une tension de 200 V, jusqu'à ce que le front de migration soit proche de l'extrémité du gel. 15 µL d'échantillon avec 5 µL de tampon de charge ont été déposés.

Une solution d'acrylamide/bis-acrylamide à 30 % avec un ratio de 37,5/1 a été utilisée pour la préparation des gels d'alignement (4 %) et de séparation (12 %).

Composition des gels :

	T final	Acryl/bis	Tampon*	Eau	APS 10 %	TEMED	Volume final
	%	mL	mL	mL	μ L	μ l	mL
Alignement	4	0,26	0,5	1,24	10	2	2
Séparation	12	1,95	1,25	1,8	25	5	5

*Tampon pour le gel d'alignement : Tris-HCl 0,5 M pH 6,8. Tampon pour le gel de séparation : Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.

Composition du tampon de charge (4X):

Elément	volume
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
glycérol	1,6 mL
eau	5 mL
EDTA 0,5 M	80 μ L
bleu de bromophénol 0,5 %	0,4 mL

Composition du tampon de migration :

Elément	quantité
Tris	12,5 mM
Glycine	96 mM
EDTA	0,5 mM
eau	qsp 1 L

2. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'agarose à 0,7% dans le tampon Tris-Acetate-EDTA (TAE, Tris-Acétate 40 mM; EDTA 2 mM) sur un système HU20-C1-16 (Fisherbrand) avec refroidissement (gel de 20x20 cm). 20 μ L d'échantillon contenant le polysaccharide avec 5 μ L de tampon de charge ont été déposés. La chambre de migration était refroidie grâce à une circulation d'eau à 4°C. La migration (1h30 à 200 V) a été réalisée dans du TAE 1x.

3. Electrophorèse en gel de poly-acrylamide avec dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)

L'électrophorèse SDS-PAGE pour analyser les protéines a été réalisée sur un système Mini-Protean III (Biorad) à une tension de 200 V, jusqu'à ce que le front de migration soit proche de

l'extrémité du gel. 15 μ L d'échantillon avec 5 μ L de tampon de charge ont été déposés. Les échantillons ont préalablement été dénaturés par 4 minutes d'incubation à 100°C au bain-marie.

Une solution d'acrylamide/bis-acrylamide à 30 % avec un ratio de 37,5/1 a été utilisée pour la préparation des gels d'alignement (4 %) et de séparation (12 %).

Gel	T final %	Acryl/bis mL	Tampon* mL	Eau mL	SDS 10 % μ L	APS 10 % μ L	TEMED μ l	Volume final mL
Alignement	4	0,26	0,5	1,24	20	10	2	2
Séparation	12	1,95	1,25	1,8	50	25	5	5

*Tampon pour le gel d'alignement : Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, Tampon pour le gel de séparation : Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.

Composition du tampon de charge SDS-PAGE (4x):

Elément	quantité
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
glycérol	1,6 mL
eau	3,4
SDS 10 % (w/v)	1,6
EDTA 0,5 M	80 μ L
Beta mercaptoéthanol	0,4 mL
bleu de bromophénol 0,5 %	0,4 mL

Composition du tampon de migration :

élément	quantité
Tris	50 mM
Glycine	383 mM
SDS 10 % (w/v)	10 mL
eau	qsp 1 L

E. Colorations

1. Coloration des polysaccharides au Stains-All

Le Stains-All (Sigma) permet de colorer les protéines acides comme les phosphoprotéines en bleu. Les autres protéines sont colorées en rouge-violet ou rouge. Ce colorant a été utilisé avec succès pour la révélation des polysaccharides acides comme l'acide hyaluronique (Volpi, Maccari, & Titze, 2005).

Le gel est fixé dans 25 % d'isopropanol à l'obscurité pendant plusieurs heures. Le gel est ensuite coloré avec une solution de Stains-All à 0,005 % pendant une durée minimale de 4 heures à l'obscurité. Cette solution est préparée avec 5 mL de Stains-All 0,1 % dans du diméthyl formamide (DMF), 5 mL de DMF, 25 mL d'isopropanol, 5 mL de Tris-HCl 300 mM pH 8,8 et de l'eau milli-Q qsp 100 mL.

Le gel est ensuite décoloré dans l'eau pendant une à deux heures à la lumière avant d'être scanné.

2. Coloration des polysaccharides au réactif de Schiff.

Cette coloration est également appelée coloration PAS (Periodic Acid Schiff). Elle permet de mettre en évidence des polysaccharides ou des glycoprotéines, en les teintant de rose. Les liaisons covalentes entre les deux fonctions –OH vicinales des glycopyranoses sont oxydées par l'acide périodique. Le réactif de Schiff devient alors rose par réduction par les fonctions aldéhydes ainsi formées.

Le gel est fixé pendant une à deux heures par immersion dans un bain composé de 10 mL d'acide acétique, 35 mL de méthanol et 55 mL d'eau. Une étape d'oxydation d'une heure est ensuite réalisée dans 100 mL de périodate (0,7 g d'acide périodique dans 100 mL d'acide acétique 5 % v/v). Après un bref rinçage dans l'eau, la réduction est réalisée deux fois successivement pendant 10 minutes, dans un bain de 0,2 g de potassium dissous dans 100 mL d'acide acétique 5 % v/v. La coloration au réactif de Schiff est alors effectuée jusqu'à l'apparition de bandes roses. Le gel est ensuite décoloré dans 7,5 % d'acide acétique.

3. Coloration des protéines au bleu de Coomassie.

Le gel est placé dans la solution de coloration (Bleu de Coomassie à 0.25 % w/v dans Ethanol : Acide acétique : Eau 50 : 10 : 40) pendant environ deux heures.

Le gel est ensuite placé dans une solution de décoloration (Ethanol : Acide acétique : Eau 30 : 10 : 60) avant d'être conservé dans l'eau.

F. Précipitation des polysaccharides

A un volume de surnageant de culture ont été ajoutés trois volumes d'éthanol froid (à -20°C) et un demi volume de chlorure de sodium 1 M. Le mélange a été placé à -20°C pendant deux jours

puis centrifugé à 4°C à 5000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été éliminé par aspiration, et le culot lavé à l'éthanol avant d'être séché.

V. Biologie moléculaire

A. Amorces pour les amplifications

Tableau IV : Amorces utilisées

nom	usage	séquences 5' ---3'
R_pETM6_fw	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EcoRV	CGCGGATATCATGGACGTTGGA AACGCG
R_pETM6_rv	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EagI	CGCGCGGCCGCCAGGGGTTACT GACCTCGTCC
Q_pETM6_fw	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EcoRV	CGCGGATATCATGAATGATTTAC TTTGATTACAGGTTTTGG
Q_pETM6_rv	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EagI	CGCGCGGCCGCCTTATTGGTTGA CGCGTTTC
P_pCDM4_fw	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction NdeI	CGCGCATATGGAATTCAGACAA AAGCAAATAGCACT
P_pCDM4_rv	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction KpnI	CGCGGGTACCAAATCATTATA GCTAGCCTCCTTGG
L_pETM6_fw	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EcoRV	CGCGGATATCATGACTGAAACC AAGGTGAGAAGAAAGC
L_pETM6_rv	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EagI	CGCGCGGCCGAAATTAGGGTTT CTCATTTTGACAATCACTT
K_pETM6_fw	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EcoRV	CGCGGATATCATGTCTAAAGCA ATGACCAACATGTTCG
K_pETM6_rv	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EagI	CGCGCGGCCGTTTCAGTCATAAC GAGTATCTCTTCACCTGTC
C_pETM6_fw	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EcoRV	CGCGGATATCATGAACACGATG AAACCATTATCACCTTAG
C_pETM6_rv	Clonage cluster HE800 Path Brick, site de restriction EagI	CGCGCGGCCGTCATTACAACGCT CCTATTAACACGATG
sypG_sumo_fw	Clonage de <i>sypG</i> dans pETSUMO pour surexpression SypG	ATGAGACCAAGGGTGTACTGG TAGA
sypG_sumo_rv	Clonage de <i>sypG</i> dans pETSUMO pour surexpression SypG	TCAAGATTGTTTCGAGATTAATTT CATCC
motifG_PO_fw	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	GGAATTGCAGACTGCGTGCC
motifG_PO_rv	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	TCTTTTGTGCTTATTCTAACTCC GC
motifG_NL_fw	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	CGTGCCAAGGATTTATTTCTTAT AAAAC
motifG_NL_rv	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	GGCAGCATTAACGGTTGTTCG
motifG_IH_fw	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	GCCAAAATATGCCATTAGTTTAT GTATTTG
motifG_IH_rv	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	CAAAGCGTTATTCCTGTATTGCT ACG
motifG_GF_fw	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	GCGGTGATGAGCGAGTTATATG G

motifG_GF_rv	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	GATTTTTTCGCAAATTTCCACCT
motifG_A_fw	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	GAGCAGGTAACGTGCCAAATTTAA
motifG_A_rv	Amplification des motifs G pour hybridation SypG	CGACATCTCTCCTGAACAAGCC
EC277.23fw	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, N-acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1-phosphate N-acétyltransférase (EC 2.3.1.157)	ACGCGCATGTATTCCGATCT
EC277.23rv	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, N-acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1-phosphate N-acétyltransférase (EC 2.3.1.157)	CTGTTTTAGCAGATCGCCGC
EC111.22fw	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, UDP-glucose 6-déshydrogénase (EC 1.1.1.22)	CTCCACTGAAGCAGAAGCGA
EC111.22rv	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, UDP-glucose 6-déshydrogénase (EC 1.1.1.22)	ATGGTTGCCAATACGTGGGT
EC513.7fw	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, UDP-N-acétylglucosamine 4-épimérase (EC 5.1.3.7)	TCGGTACAAAACCGCTGGA
EC513.7rv	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, UDP-N-acétylglucosamine 4-épimérase (EC 5.1.3.7)	TTTTGCCGTAAGGGCTTTGC
EC121.12fw	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, NAD-dépendante glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12)	GATGGCCCGTCTCACAAAGA
EC121.12rv	Amorces rt-qPCR <i>E. coli</i> str. K-12 substr. DH10B, NAD-dépendante glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12)	CAGACGAACGGTCAGGTCAA
EC277.23fwVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , N-acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1-phosphate N-acétyltransférase (EC 2.3.1.157)	ATCGGTGCCGGTACGATTAC
EC277.23rvVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , N-acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase (EC 2.7.7.23) / Glucosamine-1-phosphate N-acétyltransférase (EC 2.3.1.157)	ATCAGCGATAGTGACAGGCG
EC111.22fwVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , UDP-glucose 6-déshydrogénase (EC 1.1.1.22)	AAAGGCATCGAAGTCGTGGT
EC111.22rvVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , UDP-glucose 6-déshydrogénase (EC 1.1.1.22)	GCAAGTTCCTCAACCATGCG
EC513.7fwVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , UDP-N-acétylglucosamine 4-épimérase (EC 5.1.3.7)	CGGTGGCAAACCACTTGAG
EC513.7rvVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , UDP-N-acétylglucosamine 4-épimérase (EC 5.1.3.7)	TTCAGGGTCACCGTAAACCG
EC121.12fwVd	Amorces rt-qPCR <i>V. diabolus</i> , NAD-dépendante glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12)	AAGAGCGTGCTGACATCGAA

EC121.12rvVd	Amorces rt-qPCR <i>V diabolicus</i> , NAD-dépendante glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (EC 1.2.1.12)	ACTTAAGGTCCGCTGGGTTG
R-sumo-fw	Clonage <i>sypR</i> dans Sumo	ATGGACGTTGGAACGCGTCAAC
R-sumo-rv	Clonage <i>sypR</i> dans Sumo	TTACTGACCTCGTCCGTCAATCATC
Sumo_RQP_fw	clonage du segment RQP dans pET sumo	ATGGAATTCAGACAAAAGCAAAATAGCACTC
Sumo_RQP_rv	clonage du segment RQP dans pET sumo	TTACTGACCTCGTCCGTCAATCATC
sumo_RQPO_N_fw	clonage du segment RQPON dans pET sumo	ATGACGGACATCGTAGTATTTGGAGAAGATTTTGG
sumo_RQPO_N_rv	clonage du segment RQPON dans pET sumo	TTACTGACCTCGTCCGTCAATCATC
sumo_RK_fw	clonage du segment RK dans pET sumo	ATGTCTAAAGCAATGACCAACATGTCGCTGTTC
sumo_RK_rv	clonage du segment RK dans pET sumo	TTACTGACCTCGTCCGTCAATCATC
sumo_RI_fw	clonage du segment RI dans pET sumo	ATGACTACTCCAAAACGCATTCTATATGTTCAATTATGG
sumo_RI_rv	clonage du segment RI dans pET sumo	TTACTGACCTCGTCCGTCAATCATC
sumo_RA_fw	clonage du segment RA dans pET sumo	ATGGAATTACGCAAACACTAGAAATTAATCAAGAC
sumo_RA_rv	clonage du segment RA dans pET sumo	TTACTGACCTCGTCCGTCAATCATC
SUMOT7_rv	vérif direction clonage dans sumo	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG
SUMOT7_fw	vérif direction clonage dans sumo	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG
Wza-sonde-fw	Criblage par hybridation sur membrane	GTCCAAGGCTACGTGGTCAA
Wza-sonde-rv	Criblage par hybridation sur membrane	CACATTTGCACCCGCTTTGA
pGT1-sonde-fw	Criblage par hybridation sur membrane	GTTGGAAACGCGTCAACCAA
pGT1-sonde-rv	Criblage par hybridation sur membrane	TAGGCCCGTAATTCCCGGTA
promA1-fw	amplification zone du promoteur situé avant <i>sypA</i>	AGCCACTTGCGTCTAAGTCA
promA1-rv	amplification zone du promoteur situé avant <i>sypA</i>	CATCTCTCCTGAACAAGCCGT
promA2-fw	amplification zone du promoteur situé avant <i>sypA</i>	GACAGCCACTTGCGTCTAAG
promA2-rv	amplification zone du promoteur situé avant <i>sypA</i>	ACTCTTGCTTTAGCGCTCGAT
Lev_C1_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GGTGTGTCGCGGAGCG
Lev_C1_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	CTGTCATCGTGCCCGCC
Lev_C2_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	ACAGTGTATCGGAGCAGATTGC
Lev_C2_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GTTTGGGCATTGGATTAGCGACG
Lev_C3_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	AGGTAGAGTGGTGATCACAGGAACGCCAAG
Lev_C3_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	ACCACGACACGGTTGCCAAGCACAAC

Lev_C4_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	ACATCAGCCGCGTTAACCAGTG
Lev_C4_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GCTTTGGATTGTTATGCCTCACC
Lev_C5_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GCGGGGCGAAACATAGTGCGAC
Lev_C5_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	CCTACGCTCTCAGTGTGGTGTG
Lev_C6_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GGATGACGATGCACATGCCTG
Lev_C6_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	CAATCTCGTTGGTGGCTGGAG
Lev_C7_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GCCCTGTTTGATAAGGCTGTTCC ATCCGC
Lev_C7_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GCGCCACCAACCGAGATCCATT AACAGAAG
Lev_C8_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GCTCGCGCAGAGGGGGCATATC G
Lev_C8_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	CCTCAAGTGATTGCGGGCGTATG TGATGC
Lev_C9_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	TTCGAGTTGGGTTGCCGTCGTAG AGCC
Lev_C9_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	CTGTTTGTTCAGCATCTCCACT CGTTGGG
Lev_C10_fw	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	GCGCTATCGCCTGAGTTCGCG
Lev_C10_rv	Recombinaison du cluster HE800VB dans la levure, utilisée pour le séquençage des clusters des souches recombinantes.	TCGACATCTCTCCTGAACAAGCC GTC
sypA_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypA</i>	GCTGTGACAAGCACAACATCA
sypA_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypA</i>	TGGCACCAATCCCTGAAGAA
sypB_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypB</i>	CGGCATGTTTGGTTGTTCTG
sypB_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypB</i>	AACCTCAACCCATGCTCTGGA
sypC_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypC</i>	GTCCAAGGCTACGTGGTCAAAC C
sypC_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypC</i>	CCAATTCGGGAGCTGGCTA
sypD_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypD</i>	GTTGCCGTCGTAGAGCCATAATG
sypD_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypD</i>	TCAATTGGCGTACCGAGACCC

sypF_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypF</i>	ACGAGAGCGCATGGAGAAAATA G
sypF_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypF</i>	TTGTCTGGAAAGCGTTCGGTT
sypG_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypG</i>	TCGACAGCGAAGCTCAACATAT C
sypG_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypG</i>	AGTTACATGTGCGGGAGTGGAT G
sypH_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypH</i>	GGGTCGCTTGCCCCGATATTA
sypH_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypH</i>	GCTTTGCGCCGAGAAATCAT
sypI_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypI</i>	ATCGTGGCTCCTAAAACGGGA
sypI_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypI</i>	GCTGCAGTCGTGAGGTTTTGG
sypJ_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypJ</i>	CCTACGCTCTCAGTGTGGTGTGT
sypJ_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypJ</i>	AACGACGCCACATTGTTTTGG
sypK_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypK</i>	TGCGTTTTGTCTCAATGGCG
sypK_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypK</i>	TGATGCGCACAGCTTCTGTACTC
sypL_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypL</i>	AGCCCTCACTGGGATGGTATCA
sypL_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypL</i>	AATCCGATGTTGGCGTCAGTAGT
sypN_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypN</i>	CAGCAAGTGACAAACTCGCCA
sypN_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypN</i>	CTGCCATAAAAGCCCAGCACTT
sypO_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypO</i>	TCGCTTCAAGAGGGTTTCCC
sypO_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypO</i>	AGCTTCCGCCAAAGAGAACACT
sypP_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypP</i>	TCGCTTCAAGAGGGTTTCCC
sypP_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypP</i>	AGCTTCCGCCAAAGAGAACACT
sypQ_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypQ</i>	TGCTGGGTTCAACGATTGGT
sypQ_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypQ</i>	CTCCGTCGTCTGAGCTTTGTTC
sypR1_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypR</i>	GCTCGTCACTGCACCACTAT
sypR1_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypR</i>	TTTTCGGTTGCCCAAACACTGC
sypR2_fw	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypR</i>	TATGCCACGCGAAAAGAACG
sypR2_rv	Amorces rt-qPCR Gène <i>sypR</i>	AGCGTTGCTCCGCATCAATA
KfiD-fw	Vérification présence de <i>kfiD</i>	CGCGGATCCAAACAAACACC
KfiD-rv	Vérification présence de <i>kfiD</i>	GCGCTGGTTACGTTGGGC
Wbpp-fw	Vérification présence de <i>wbpp</i>	ACATCAAGCTGCCTTGGGTT
Wbpp-rv	Vérification présence de <i>wbpp</i>	AGGTTCCCGGTGATAGGACA
sypG_OXB18 _EagI_fw	Pour clonage <i>sypG</i> chez <i>E. coli</i> (vecteur pSF-OXB18)	CGCGCGCCGATGAGACCAAGG GTGTTACTGTTAGA

sypG_OXB18 _EcoRV_rv	Pour clonage <i>sypG</i> chez <i>E. coli</i> (vecteur pSF-OXB18)	CGCGGATATCTCAAGATTGTTCC AGATTAATTTTCATCC
ox18_sypG_v erif_fw	Vérification du clonage de <i>sypG</i> (vecteur pSF-OXB18)	AAACGCCGTGTGCTCGATC
ox18_sypG_v erif_rv	Vérification du clonage de <i>sypG</i> (vecteur pSF-OXB18)	CATGTCTGTGAGCTGAAGGTAC GC
8F	ADNr16S lors de l'analyse transcriptomique	AGAGTTTGATCATGGCTCAG
1489R	ADNr16S lors de l'analyse transcriptomique	GTTACCTTGTTACGACTTCAC

B. Extraction et vérification d'acides nucléiques

1. Extraction d'ADN génomique total

L'ADN génomique total a été extrait avec le kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega) selon les directives du fabricant.

2. Extraction d'ADN plasmidique

En fonction de la finalité de l'extraction (vérification d'un clone ou clonage), deux protocoles ont été utilisés. La méthode au GTE (Glucose/Tris/EDTA) (Ausubel et al., 2002), permet d'extraire une quantité importante de matériel nucléique, et d'obtenir des solutions à 4 µg/µL en moyenne. Le kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Scientific a également été utilisé pour sa rapidité et la pureté des produits obtenus ; cependant, les rendements étaient parfois insuffisants.

L'extraction des fosmides a été réalisée avec le kit FosmidMAX™ DNA Purification d'Episcience, selon les directives du fabricant.

3. Purification et extraction des produits PCR

Les produits de PCR ont été purifiés si nécessaire avec le kit PCR Clean-Up System (Promega). Le même kit a été utilisé pour l'extraction et la purification d'acides nucléiques à partir des gels d'agarose.

4. Quantification des acides nucléiques

Les préparations d'acides nucléiques ont été quantifiées au spectrophotomètre, NanoVue™ Spectrophotometer, ou sur gel d'agarose à l'aide du marqueur de taille 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

5. Electrophorèse des acides nucléiques

Les échantillons d'acides nucléiques ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 0.7% dans TAE 1x contenant du SYBR™ safe, incorporé dans le gel (Thermo Fisher Scientific).

Les gels ont été photographiés avec l'appareil Gel Doc™ XR+ (Biorad) et le logiciel Image Lab™. Les préparations d'acides nucléiques destinées au clonage ont été visualisées sur gel avec un transilluminateur en lumière bleue (Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator, Fisher Scientific) après immersion dans un bain de SYBR® Gold (Invitrogen).

6. Séquençages

Le séquençage des produits de PCR a été réalisé en sous-traitance par la Société GATC Biotech.

C. Amplifications par PCR

Les amplifications ont été programmées dans les appareils MyCycler (Biorad) ou PCR Express (Hybaid).

1. Amplifications de vérification

L'ADN polymérase Dream Taq™ (Thermo Scientific) a été utilisée pour vérifier la présence de différents gènes.

Mélange réactionnel pour une réaction effectuée dans 50 µL :

élément	quantité
tampon Dream Taq 10X	5 µl
dNTP 2mM	5 µL (0,2 mM de chaque)
amorces sens	0,5 µM
amorces anti-sens	0,5 µM
matrice ADN	10 pg-1 µg (1 µL)
ADN polymérase Dream Taq™	1,25 U
eau	qsp 50 µL
volume total	50 µL

Programme :

étape	température (C°)	durée
dénaturation initiale	95	1-3 min
dénaturation	95	30 s

hybridation	Tm-5	30 s	} x 35
élongation	72	1-2 min	
élongation finale	72	10 min	

2. Amplifications haute fidélité pour clonage et séquençage

L'ADN polymérase Phusion (Thermo Scientific) a été utilisée pour l'amplification de fragments destinés au clonage et/ou au séquençage.

Mélange réactionnel pour une réaction effectuée dans 50 μ L :

élément	quantité
tampon HF Phusion 5X	10 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
amorce sens	0,5 μ M
amorce anti-sens	0,5 μ M
matrice ADN	50-250 ng
polymérase Phusion	0,5 μ L
eau	qsp 50 μ L
volume total	50 μ L

Programme :

étape	température (C°)	durée	} x 35
dénaturation initiale	98	30 s	
dénaturation	98	10 s	
hybridation		20 s	
élongation	72	20 s/kb	
élongation finale	72	10 min	

La température d'hybridation a été calculée selon les directives du fabricant de l'ADN polymérase sur le site www.thermoscientific.com/pcrwebtools.

3. Amplification de longs fragments

Le mélange d'enzymes Long PCR (K0189, Thermo scientific) a été utilisé pour le clonage de fragments de différentes tailles du cluster génétique de biosynthèse de l'EPS HE800. Ce mélange est composé de l'ADN polymérase Taq et d'une ADN polymérase avec une activité correctrice.

Mélange réactionnel pour une réaction effectuée dans 50 μL :

élément	quantité
tampon Long PCR 10X	10 μL
dNTPs (2 mM chaque)	5 μL
amorces sens	0,7 μM
amorces anti-sens	0,7 μM
matrice ADN	10 pg-1 μg
mélange Long PCR	0,5 μL
eau	qsp 50 μL
volume total	50 μL

Programme :

étape	température (C°)	durée	
dénaturation initiale	94	1-3 min	
dénaturation	95	20 s	x 10
hybridation	T _m -5°C	30 s	
élongation	68	60 s/kb	
dénaturation	94	20 s/kb	x 20
hybridation	T _m -5°C	30 s/kb	
élongation	68	60 s/kb+5 s à chaque cycle	
élongation finale	68	10 min	

D. RT-qPCR

La RT-qPCR a été utilisée pour analyser le niveau de transcription de différents gènes (chapitre 3 et 4). Des amorces ont été dessinées de façon à obtenir des amplicons de taille comprise entre 111 et 216 pb.

1. Dessin des amorces

Les amorces ont été dessinées avec Primer-Blast, et vérifiées avec Primer3Plus ; le T_m a été évalué avec l'aide PCR de l'université Paris-Descartes (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/PCRProg.html>); l'absence de hairpin a été contrôlée avec Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Les hybridations aspécifiques potentielles ont été évaluées *in silico* par Blast sur MAGE contre le génome de *V. diabolicus* et de *E.coli* DH10B (équivalent à Epi100).

2. Échantillonnage

Un volume d'échantillon a été placé dans deux volumes de RNA Later, vortexé rapidement puis laissé 5 minutes à température ambiante. L'ensemble a été centrifugé à 5000 tr/min pendant 10 min. Les culots obtenus lors des échantillonnages ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse PCR.

3. Extraction des ARN totaux

Les culots après traitement au RNA Later ont été resuspendus dans 150 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) contenant 1 mg mL⁻¹ de lysozyme, vortexés puis incubés à température ambiante pendant 5 minutes et extraits avec le kit Nucleospin RNA plus (Macherey-Nagel). L'élution finale a été effectuée avec 30 µL d'eau (passés 2 fois). Des aliquots de 5 µL ont été réalisés et conservés à -80°C pour évaluation ultérieure de l'intégrité des ARN au Bioanalyzer (Agilent). Le matériel obtenu a été quantifié au Nanovue.

4. Synthèse des ADNc

La synthèse des ADNc (ADN complémentaires) a été réalisée avec le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis en présence de dsDNase (Thermo Scientific). Environ 2 µg de matrice ont été utilisés pour chaque réaction. Les produits, quantifiés au Nanovue, ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

5. PCR quantitative ou qPCR

L'analyse par PCR quantitative (qPCR) a été réalisée avec le kit Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix (Thermo scientific) et l'appareil CFX96 Real Time System de Bio-Rad. Le volume réactionnel était de 10 µL, l'hybridation a été effectuée à 61°C. Les matrices ont été diluées à 50 ng µL⁻¹, et la même quantité (2 µL) a été utilisée pour chaque réaction. Un témoin NTC contenant le mélange réactionnel de base et les amorces D mais pas de matrice ADNc et un témoin RT- dans lequel l'enzyme n'était pas ajoutée ont été effectués pour chaque plaque de 96 puits.

6. Analyse des ARN extraits au Bioanalyzer

L'intégrité des ARN a été vérifiée au Bioanalyzer (Agilent).

E. Hybridation sur membrane

L'hybridation sur membrane a été utilisée pour cribler les souches recombinantes ayant intégré le gène ou le cluster de gènes voulu.

1. Synthèse et marquage des sondes

Après leur synthèse par PCR, et la vérification de leur taille sur gel d'agarose, les sondes ont été marquées selon le kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). La concentration des sondes a été déterminée à l'aide du réactif Quant-IT™ PicoGreen de chez Invitrogen.

2. Préparation des membranes

Les clones ont été repiqués sur du milieu solide LB Cm Glucose 30g/L en double exemplaire (une boîte de Petri pour la membrane et une boîte pour la sauvegarde). Lorsque les colonies ont été visibles, une membrane en nitrocellulose a été déposée sur chaque boîte, l'incubation a été poursuivie quelques heures, une colonie de *V. diabolicus* a été rajoutée en tant que témoin positif sur chaque membrane, avant d'être soumises à un traitement destiné à mettre l'ADN bactérien « à nu ».

Chaque membrane a été placée sur un paquet de trois feuilles de papier Whatman 3MM saturées avec une solution de dénaturation (1,5M NaCl, 0,5M NaOH) et incubée pendant 10 minutes. Après un transfert sur trois nouvelles feuilles de papier Whatman 3MM saturées avec la solution de neutralisation (1M NaCl, 0,5M Tris-HCl pH7) et une incubation de 5 minutes, la membrane a à nouveau été placée sur trois feuilles de papier Whatman 3MM saturées avec la solution SSC 6x (0.9 M NaCl, 0.09 M de citrate trisodique, pH 7) pendant 2 minutes avant d'être séchée sur de nouveaux papiers à 80°C pendant 2 heures pour fixer l'ADN.

3. Hybridation et révélation

L'hybridation a été réalisée conformément aux directives du kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche), à une température de 40°C, suivie de lavages stringents à température ambiante.

La sonde est marquée avec de la digoxigénine-11-dUTP. Elle est détectée, après hybridation sur la membrane, par hybridation avec l'anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline, par le kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

Le protocole du kit préconise la détection par chimioluminescence. La mesure par chemiluminescence n'était pas disponible au laboratoire. La révélation a été effectuée avec le réactif SIGMAfast™ BCIP®/NBT tablet, selon les directives du fabricant (SIGMA). Ce réactif produit une coloration mauve en présence de l'alkaline phosphatase, utilisée pour marquer les anticorps anti-DIG, eux-mêmes hybridés à la sonde.

D'après la mise au point effectuée durant ce travail, la coloration la plus intense de l'ADN témoin de *V. diabolus* (1 µg), a été obtenue pour une température d'hybridation de 40,4°C, et des lavages stringents effectués à température ambiante.

F. Constructions génétiques

Les clonages de gènes dans le vecteur pET-SUMO et conduisant aux plasmides recombinants pET-SUMO-sypG, pET-SUMO-pGT, pET-SUMO-RQP, pET-SUMO-RQPON et pET-SUMO-RK ont été réalisés selon les directives du kit Champion™ pET SUMO Protein Expression System (Thermo Fisher scientific). Le clonage du cluster HE800 dans le fosmide pCC1FOS a été réalisé selon les directives du kit EpiFOS™ Fosmid Library Production (Epicentre). Les clonages dans les vecteurs pSF-OXB18, pETM6 et pCDM4 (pSF-OXB18-sypG, pETM6-R, pETM6-Q, pETM6-L, pETM6-K, pETM6-C et pCDM4-P) ont été réalisés par l'utilisation d'enzymes de restriction.

1. Restrictions enzymatiques

Des amorces comportant des sites de restriction ont été dessinées afin de procéder au clonage. Des sites pouvant être coupés par EcoRV et EagI, ont été ajoutés aux extrémités des amorces utilisées pour un clonage dans le pETM6. Les mêmes sites ont été utilisés pour la construction du plasmide pSF-OXB18-sypG. Des sites de restriction pour les enzymes NdeI et KpnI ont été utilisés pour le clonage dans le pCDM4.

Les digestions ont été réalisées dans le tampon de restriction approprié pour l'enzyme ou le mélange d'enzymes selon le protocole du fournisseur (Thermo Fisher Scientific).

Composition d'une réaction de digestion :

élément	quantité
Tampon	1x
enzyme	1 µL (de chaque)
ADN	0,7 µg
eau	qsp 50 µL

Les réactions de digestion ont été incubées pendant 2h à 37°C, elles ont ensuite été analysées par électrophorèse en gel d'agarose. Les fragments digérés ont été purifiés après extraction du gel.

2. Ligation

Les ligations ont été effectuées avec l'enzyme T4 DNA Ligase selon les directives du fabricant (Promega).

Les quantités d'insert (ng) et de vecteur (ng) nécessaires ont été calculées selon la formule donnée par le fabricant :

$$\text{insert (ng)} = \frac{\text{vecteur (ng)} \times \text{taille de l'insert (kb)}}{\text{taille du vecteur (kb)}} \times \text{ratio molaire désiré} \left(\frac{\text{insert}}{\text{vecteur}} \right)$$

Composition d'une réaction de ligation (exemple pour un vecteur de 3 kb et un insert de 0,5 kb) :

élément	quantité
vecteur	100 ng
insert	50 ng
tampon 10 X	1 µL
T4 DNA Ligase	0,5 U
eau	qsp 10 µL

Les réactions de ligation ont été incubées une nuit à 4°C et utilisées sans délai pour les transformations.

3. Transformation

a) Préparation des cellules compétentes au chlorure de calcium

100 mL de milieu LB ont étéensemencés avec 1 mL de préculture fraîche d'*E. coli*. L'ensemble a été incubé à 37°C sous agitation jusqu'à atteindre une absorbance à 600 nm de 0,375. 25 mL (2 fois) de culture ont été répartis dans deux tubes de 50 mL stériles et laissés dans la glace pendant 10 minutes avant d'être centrifugés à 1600 g à 4°C pendant 7 minutes. Les surnageants ont été éliminés et les culots resuspendus dans 5 mL d'une solution de calcium glacée (CaCl₂ 60 mM, PIPES 10 mM pH 7, glycérol 15%). Après une nouvelle centrifugation à 1100 g à 4°C pendant 5 minutes, les surnageants ont été éliminés et les culots resuspendus dans 5 mL de solution de calcium glacée, puis laissés dans la glace pendant 30 minutes. La centrifugation a

été répétée une fois et les culots ont été resuspendus dans 1 mL de solution de calcium glacée et aliquotés en microtubes par 200 μ L et stocké à -80°C , ou utilisé immédiatement.

b) Transformation par choc thermique

Dans un tube à fond rond, 10 ng de plasmide ou 20 μ L de réaction de ligation ont été pré-incubés dans la glace. 100 μ L de bactéries compétentes décongelées dans la glace ont été ajoutés ; l'ensemble a été homogénéisé délicatement et incubé dans la glace pendant 10 minutes avant d'être soumis à un choc thermique à 42°C , au bain-marie, pendant 2 minutes. 1 mL de milieu SOC (tryptone 2 %, extrait de levure 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10 mM et glucose 20 mM) a été ajouté et le mélange de transformation a été incubé à 37°C sous agitation pendant une heure. Différents volumes (10, 50 et 100 μ L) ont été étalés sur des milieux LB gélosés supplémentés en antibiotique approprié pour la sélection des clones transformés. Les boîtes de Petri ont été incubées pendant au moins 24 heures à 37°C .

G. Transcriptomique

1. Cinétique préliminaire

Les cultures ont été réalisées en triplicat, dans des erlenmeyers de 500 mL, à 30°C sous agitation (150 rpm). Chaque erlenmeyer contenait 100 mL de milieu ZPHUF, additionné ou non de glucose à 30 g/L. L'ensemencement a été effectué au 1/50ème à partir d'une pré-culture fraîche incubée pendant la nuit. Des prélèvements ont été effectués au bout de 6, 10 et 26 heures de culture. La mesure de l'absorbance à 620 nm a été effectuée en microplaquesur 300 μ L de culture non diluée.

Deux volumes de RNALater ont été ajoutés à un volume de prélèvement dans un tube à centrifuger de 15 mL ou un microtube de 2 mL selon les prélèvements (prélèvements de 1.8 mL à 6h et 10h et de 600 μ L à 26h). L'ensemble a été vortexé immédiatement, incubé à température ambiante pendant 5 minutes, puis centrifugé à 5000 rpm min^{-1} pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé, et les culots ont été conservés à -20°C pour extraction des ARN totaux. Pour la visualisation ultérieure des EPS produits sur gel d'agarose, 250 μ L de culture ont été centrifugés à 10 000 rpm/min pendant 15 minutes. Un prélèvement du surnageant a été effectué (45 μ L + 15 μ L de tampon de charge pour électrophorèse des EPS) puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2. Extraction des ARN totaux

Les culots ont été repris dans 150 μL de lysozyme à 1 mg/mL préparé dans le TE, vortexés, puis incubés à température ambiante pendant 5 minutes. La suite de l'extraction a été réalisée selon le protocole du kit NucleoSpin RNA Plus, de Macherey-Nagel. Pour chaque échantillon, un aliquot de 5 μL a été réalisé pour vérification ultérieure de l'intégrité des ARN au Bioanalyzer. L'ensemble des échantillons a été conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Les aliquots ont été dilués à la concentration 200 ng μL^{-1} pour l'analyse au Bioanalyzer 2100 (Agilent).

Les échantillons ont été traités à la DNase I (Ambion®) selon le protocole du fournisseur. Les échantillons ont ensuite été soumis à une amplification par PCR avec les amorces correspondant à l'ADNr16S, et l'ADN génomique de *V. diabolicus* comme témoin. L'objectif était de détecter une éventuelle contamination à l'ADN. Les échantillons ont été transmis à la société GATC Biotech pour le séquençage RNA_seq.

VI. Bioinformatique

A. Plateforme Microscope

Le génome séquencé de *V. diabolicus* est déposé sur MaGe (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/index.php>). MaGe est une plate-forme en ligne d'analyses et d'annotations de génomes, qui dépend du Génomoscope, centre national français du séquençage (Evry).

B. Outils pour les dessins d'amorces

Les amorces (Tableau IV) ont été dessinées avec Primer-Blast, et vérifiées avec Primer3Plus ; le T_m a été évalué avec l'aide PCR de l'université Paris-Descartes (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/bio2/PCRProg.html>); l'absence de hairpin a été contrôlée avec Oligo Calc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Les hybridations aspécifiques potentielles ont été évaluées in silico par Blast sur MAGE contre le génome de *V. diabolicus* et de *E.coli* DH10B (équivalent à Epi100).

C. Bases de données

Différentes bases de données ont été utilisées.

- Les bases de données et les outils du NCBI (Centre National d'Informations Biotechnologiques), situé aux Etats-Unis dans le Maryland (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).
- L'ensemble de bases de données KEGG (Encyclopédie de Kyoto de Gènes et de Génomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>).
- La base The SEED, qui propose des simulations de réseaux métaboliques, en fonction des génomes disponibles (http://www.theseed.org/wiki/Home_of_the_SEED).
- La base CAZy (développée par le groupe de Glycogénomique du laboratoire Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, à Marseille), qui répertorie les enzymes qui permettent de dégrader, modifier ou polymériser des sucres (<http://www.cazy.org/>).

D. Analyse des résultats RNA-seq :

Les résultats obtenus ont été à la fois analysés grâce à différents outils de la plate-forme Galaxy (Tableau V), un traitement automatique a également été réalisé par la plateforme Microscope.

Tableau V : Outils Galaxy utilisés dans le déroulement de l'analyse du RNA-seq

Nom	Etape	Type	Rôle
FastQC:Read QC	1	Contrôle des qualités	Visualisation de la qualité des séquences (% GC par séquence, distribution des séquences en fonction de leur taille).
Cutadapt	2	Contrôles des qualités	Elimination des adaptateurs utilisés lors du séquençage
Reads quality filter (FastQ)	3	Contrôles des qualités	Elimination des reads orphelines
FastQC:Read QC	4	Contrôles des qualités	Permet de valider le bon déroulement des étapes précédentes (comparaison de la taille des fichiers entre l'étape 1 et l'étape 4)
Tophat2	5	Alignement	Alignement des séquences nettoyées avec le génome de référence (<i>V. diabolicus</i>)
htseq count	6	Analyse transcriptionnelle	Dénombrement des reads alignés sur la même zone
GFOLD	7	Analyse transcriptionnelle	Analyse de l'expression différentielle de gènes

L'analyse effectuée avec le logiciel GFOLD permet d'obtenir les résultats organisés sous forme d'un tableau (Tableau VI). La première colonne, intitulée « GeneSymbol » contient le nom des gènes. Le GFOLD est un indice qui permet de valider les valeurs de log2fdc calculées, ces deux

valeurs doivent être proches. Il n'existe cependant pas de consensus quant au seuil fixé. Le $\log_2\text{fdc}$ est la différence de niveau d'expression d'un gène dans deux conditions étudiées ; cette différence est significative si $\log_2\text{fdc} \geq 2$ en valeur absolue. E-FDR est le FDR (False Discovery Rate) empirique et donne une estimation des faux positifs (valeurs brutes de $\log_2\text{fdc}$ inférieures à 2,5 en valeur absolue). Le GFOLD constitue une correction des valeurs de $\log_2\text{fdc}$. La colonne « GFOLD(0.01) » donne les valeurs de GFOLD obtenues avec FDR inférieur ou égal à 0,01. 1stRPKM et 2ndRPKM sont les nombres de reads par kilobase de séquence génomique et par millions de reads mappées (RPKM, Reads Per Kilobase per Million mapped reads) de, respectivement, la condition 1 (sans glucose) et la condition 2 (avec glucose). Le RPKM est un indice représentant le nombre de séquences d'ADNc alignées sur un gène, par rapport au nombre total de séquences obtenues pour la condition considérée.

Tableau VI : Exemple de résultats obtenus après traitement des données RNA-Seq par le logiciel GFOLD.

GeneSymbol	GFOLD(0.01)	E-FDR	$\log_2\text{fdc}$	1stRPKM	2ndRPKM
VDIABv1_100558	10,2728	0	11,48	0,533633	1868,8
VDIABv1_100546	-6,72718	0,00793651	-8,35	1016,1	1,0047
VDIABv1_110499	2,07504	0,0533626	2,84	181,366	1164,53
VDIABv1_220159	0	0,999806	0,86	19,4237	30,6091
VDIABv1_100136	1,6299	0,0652174	2,84	0,673309	4,9876
VDIABv1_30389	-1,21915	0,100568	-2,14	617,979	126,34

Lors de notre analyse, seules les variations de $\log_2\text{fdc}$ supérieures ou égales à 2 en valeur absolue, validées par une valeur absolue seuil de GFOLD(0.01) supérieure ou égale à 1,95 ont été retenues (en vert dans le tableau VI). Le gène VDIABv1_100558 a été exprimé 11,48 fois plus en présence de glucose, alors que le gène VDIABv1_100546 l'a été 8,35 fois moins. Pour les gènes VDIABv1_100136 et VDIABv1_30389, il n'y a pas de différence significative d'expression compte-tenu de la valeur seuil de GFOLD considérée (Tableau VI).

« Le pessimiste répond : « la situation est catastrophique, elle ne peut pas être pire. » Et l'optimiste de lui répondre « Mais si, bien sûr, cela peut toujours être pire. » »

Katia Chapoutier

Troisième partie : Résultats et discussion

Chapitre 1 : Diversité du cluster de biosynthèse d'EPS au sein des *Vibrionaceae*

I. Objectifs

Différentes fonctions cellulaires ont été attribuées aux exopolysaccharides. Ils contribuent aux interactions inter-organismes en facilitant l'adhésion cellulaire, la formation de biofilms et la symbiose (S. Shibata et al., 2012). Ils apportent également aux microorganismes une protection contre la dessiccation et permettent de piéger des nutriments ou des composés toxiques, apportant ainsi une meilleure survie dans des environnements appauvris ou pollués (Decho & Gutierrez, 2017; S. B. Liu et al., 2013; Nichols, Garon, Bowman, Raguene, & Guezennec, 2004; Poli, Anzelmo, & Nicolaus, 2010).

Les bactéries du genre *Vibrio*, appartenant à la famille des *Vibrionaceae* sont ubiquitaires et très abondants dans les divers habitats marins. Par ailleurs, certains *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) présentent un risque sanitaire élevé dans les produits de la mer mais aussi dans l'eau de mer (LeRoux et al., 2015). De nombreuses études ont donc été menées sur les *Vibrio* et de nombreux génomes sont aujourd'hui disponibles dans la base de données du NCBI (1803 génomes de 85 espèces de *Vibrio* différentes).

Les bactéries du genre *Vibrio* produisent des EPS variés. Certains sont décrits comme par exemple ceux de *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *A. fischeri*, *V. neocaledonicus sp. Nov.*, *V. diabolicus* (Bramhachari & Dubey, 2006; Bramhachari et al., 2007; Chalkiadakis et al., 2013; Kavita, Mishra, & Jha, 2011; Muralidharan & Jayachandran, 2003; Yip et al., 2005). La composition des EPS produits par *V. fischeri* et *V. diabolicus* a été étudiée, et leurs productions reliées à la présence d'un cluster spécifique (Goudenege et al., 2014; E. S. Yip et al., 2005).

Pour certaines espèces, un ou plusieurs clusters ont été reliés à la production d'un biofilm, comme les clusters *vps* de *V. cholerae*, ou les loci *brp* et *rbd* de *V. vulnificus*, mais les EPS correspondants n'ont pas été caractérisés (Fidopiastis, von Boletzky, & Ruby, 1998; Khrulnova, Manukhov, & Zamil'gel'skii, 2011). Pour d'autres, aucun cluster n'a été relié à la production

d'EPS. Les biofilms sont des matrices complexes, incluant des EPS, des protéines, des lipides et de l'ADN extracellulaire (Hansen, Bjelland, Ronessen, Robertsen, & Willassen, 2014). Isoler des EPS de biofilms afin de les caractériser reste un procédé complexe.

Afin d'évaluer la distribution générale de clusters similaires au cluster de biosynthèse de l'EPS HE800 chez les *Vibrio*, sa présence a été recherchée au sein des Vibrionaceae. La présence du cluster a ainsi été recherchée par analyse bioinformatique parmi les genres *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Enterovibrio*, *Grimontia* et *Salinivibrio*.

II. Résultats

Au sein des 103 génomes représentatifs des Vibrionaceae analysés, 72 clusters ont été identifiés parmi les genres *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Photobacterium* et *Enterovibrio*.

Ces clusters sont globalement bien conservés, en particulier au niveau de la synténie. Ce cluster pourrait avoir été acquis par un ancêtre commun et transmis au cours de la spéciation. La composition des clusters homologues n'est pas parfaitement corrélée aux positions phylogénétiques des souches étudiées (exemple *V. natriegens*). L'évolution de ce cluster semble être le fruit d'un transfert vertical associé à des réorganisations, fréquentes chez les Vibrionaceae. Les transferts de gène sont également fréquents au sein de cette famille et participent à la plasticité du génome (Hazen et al., 2015; Olendzenski & Gogarten, 2009).

Ce cluster n'est pas essentiel à la croissance des Vibrionaceae, 30% des souches étudiées au cours de ce travail en sont dépourvues. Parmi les clusters identifiés, plusieurs présentent des délétions de gènes considérés comme nécessaires à la synthèse d'un EPS. Il est donc peu probable que ces derniers soient à l'origine de la production d'un EPS. Les espèces *V. antiquarius* Ex25, *V. alginolyticus* et *V. parahaemolyticus* possèdent le cluster le plus proche de celui de l'EPS HE800.

Ce travail a été soumis pour publication.

III. Publication acceptée avec révisions mineures dans la revue BMC Research Notes

Comparative genomics reveals a widespread distribution of an exopolysaccharide biosynthesis gene cluster among Vibrionaceae.

Lou LEBELLENGER, Véronique VERREZ-BAGNIS, Delphine PASSERINI, Christine DELBARRE-LADRAT*

Ifremer, EM³B laboratory, Rue de l'Île d'Yeu, BP21105, F-44311 Nantes cedex 3, France

*Corresponding author: cladrat@ifremer.fr

Author email addresses

Lou.Lebellenger@ifremer.fr (Lou LEBELLENGER), Veronique.Verrez@ifremer.fr (Véronique VERREZ-BAGNIS), Delphine.Passerini@ifremer.fr (Delphine PASSERINI), cladrat@ifremer.fr (Christine DELBARRE-LADRAT).

Full affiliation

Ifremer, Atlantique Center, Marine Ecosystems and Marine Molecules for the Biotechnologies Laboratory, Biotechnology and Marine Resources Unit, Rue de l'Île d'Yeu, BP21105, 44311, Nantes Cedex 3, France.

Abstract

Objectives

The *eps* locus in *Vibrio diabolicus* is involved in the production of the biotechnologically valuable HE800 EPS. In this study, the distribution and diversity of similar *eps* gene clusters across Vibrionaceae and its variability in relation to phylogenetic relationship were investigated. The aim was to provide a better knowledge of the *eps* gene cluster importance and to facilitate discovery of new EPS with potent interesting bioactivities.

Results

Seventy percent of the 103 genome sequences examined display such an *eps* locus with a high level of synteny conservation. However, genetic divergence was found inside some monophyletic clades or even between some strains of the same species. It includes gene insertions, truncations, and deletions. Comparative analysis also reveals some variations in glycosyltransferase and export systems genes. Phylogenetic analysis of the Vibrionaceae *eps* gene clusters within Vibrionaceae suggests a vertical transfer by speciation but also pinpoints rearrangement events independent of the speciation.

Keywords: Vibrionaceae, exopolysaccharide, genetic biodiversity, biosynthesis, *Vibrio diabolicus*, HE800 EPS

Introduction

The marine bacterium *Vibrio diabolicus* synthesizes the HE800 EPS, which shares some structure and bioactivity features with the glycosaminoglycan hyaluronan (HA) (Delbarre-Ladrat, Siquin, Lebellenger, Zykwinska, & Collic-Jouault, 2014; Raguene, Christen, Guezennec, Pignet, & Barbier, 1997a; Rougeaux, Kervarec, Pichon, & Guezennec, 1999a). Thanks to its visco-elastic properties and biological properties on the cartilage and skin, HA is used in osteoarthritis treatment, ophthalmology, wound healing and in cosmetics. HE800 EPS has demonstrated its efficiency in bone and skin regeneration (Rederstorff et al., 2011b; Karim Senni et al., 2013; Zanchetta, Lagarde, & Guezennec, 2003a). Its biosynthesis *eps* gene cluster has been identified (Figure 1) (Goudenège et al., 2014) and appears as a good model to investigate *eps* loci in marine bacteria and find innovative glycosaminoglycan-mimetics for human health.

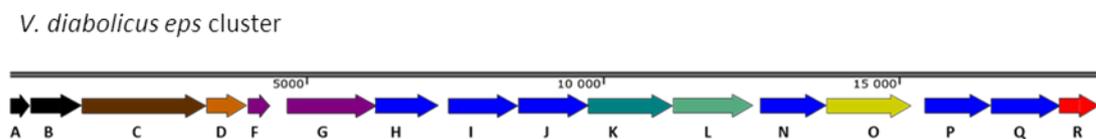


Figure 1: Genomic structure of *eps* cluster of *V. diabolicus*. Scale: base pairs.

In this study, we investigated the distribution of orthologous *eps* gene clusters across Vibrionaceae and gene variations in relation to phylogenetic relationship.

Main text

Methods

Collection of assemblies

The genomes of 103 publicly available genome sequences of Vibrionaceae members, that cover several clades, were selected (Additional File 1).

Assemblies were downloaded from NCBI ("NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed December 2016,") and three files were used: *rna_from_genomic.fna* for 16rDNA based phylogeny, *protein.faa* for homology search and *cds_from_genomic.fna* for genomic context evaluation.

Identification of the eps orthologous clusters

Proteins orthologous to *V. diabolicus* HE800 biosynthetic cluster were searched in the downloaded genomes using the standalone BLAST+ 2.2.30 package (Camacho et al., 2009). A local database gathering the 103 genomes was formatted with the *makeblastdb* program; a multifasta file containing the 16 *V. diabolicus eps* genes was used as the *blastp* query (Additional File 2).

Alignment length ratios were calculated as follows: $\text{MinLrap} = \text{Lmatch}/\min(\text{Lprot1}, \text{Lprot2})$ and $\text{MaxLrap} = \text{Lmatch}/\max(\text{Lprot1}, \text{Lprot2})$ where Lmatch = length of the match, Lprot1 (or Lprot2) = length of protein 1 (or of protein 2) and \min (or \max) = minimum (or maximum) of the two values ("Microscope. <https://microscope.readthedocs.io/en/latest/>. Accessed 18 July 2017,"). These values indicate, when both are equal to 1, that both whole proteins align. Absent genes were withdrawn from the diagram.

Alignment length, similar protein sizes, low expectation value and identity percentage (above 20%) were taken into account to identify the first gene; genomic context was further inspected to evaluate if neighboring genes also share homology with other genes of the *eps* cluster.

In silico analyses of the protein coding sequence sets

Proteins encoded by the genes inserted between D and F were identified by Blast search against the NCBI nr database ("NCBI Blast. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed April 2017,"). A phylogenetic tree was constructed using a concatenate of proteins; sequences were aligned with ClustalW and phylogenetic analyses were conducted with MEGA6 software using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987; Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

Multilocus sequence analysis (MLSA)

Five housekeeping genes and 16S rRNA gene were used for strains MLSA phylogeny (Sawabe et al., 2013) (Additional File 4). The domains used to construct phylogenetic tree were regions of *pyrH*, *gapA*, *mreB*, *gyrB*, *topA* and 16S rRNA genes of Vibrionaceae: positions 1-562, 227-893, 391-892, 442-1027, 448-1073 and 492-1355 (*V. diabolicus* numbering), respectively. Phylogenetic tree was constructed with MEGA6 using the Neighbor-Joining method (Saitou & Nei, 1987; Tamura et al., 2013).

Results and discussion

Distribution of the eps gene cluster in Vibrionaceae

Seventy-two orthologous *eps* clusters were discovered, while none could be found in the remaining thirty-one genomes, which include *Grimontia* and *Salinivibrio* members (Figure 2A, Additional Files 2 and 3). *V. ichthyenteri* was found to possess a gene cluster similar to *eps* one but it was not further analyzed because the cluster is split at the ends of two distinct contigs.

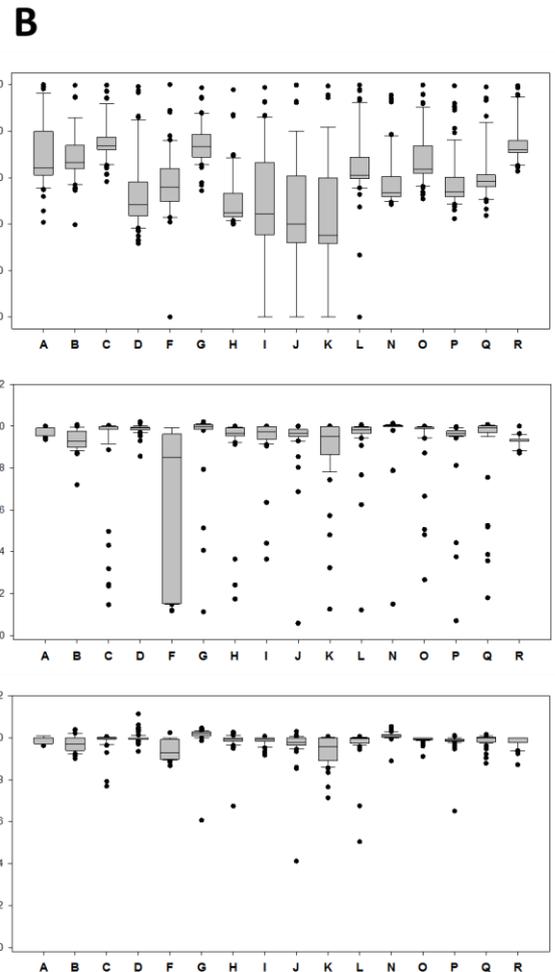
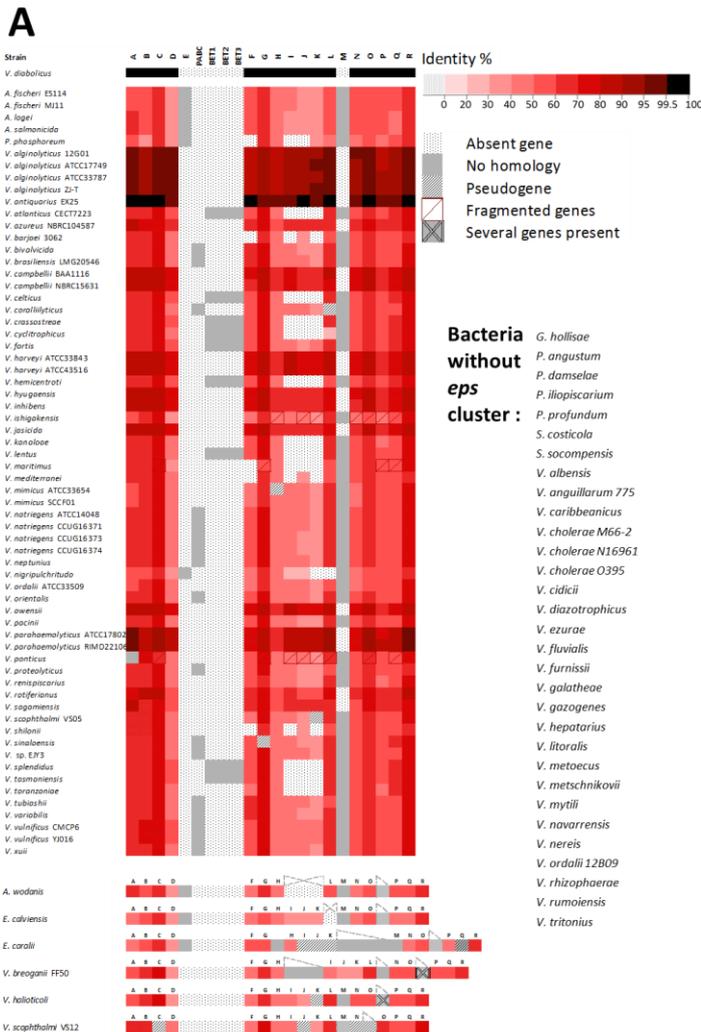


Figure 2: Biodiversity of the *eps* cluster among Vibrionaceae. **A:** Protein components of the orthologous clusters with the identity % to *V. diabolica* protein. Color legend is located at the top right portion, red level shows increasing identity by from light red to black. Dotted position are absent proteins, grey ones are proteins that do not exist in the HE800 cluster. **B:** Boxplots showing distribution of data set from identity %, MaxLrap and MinLrap of A, B, C, D, F, G, H, I, J, K, L, N, O, P, Q and R proteins in comparison with *V. diabolica* proteins. In the boxes, the 25th, 50th and 75th percentiles are indicated by the bottom, middle and top lines respectively. Whiskers show the 10th and 90th percentiles. Individual dots are the outliers.

Variability of the *eps* gene cluster

The global synteny of the gene cluster was highly conserved, particularly in the 5' end of the cluster (A, B and C genes) and in the 3' end which always encompasses gene R. The species possessing the *eps* cluster the most similar to the *V. diabolica* one, are *V. antiquarius* Ex25, *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* (Figure 2A). The most conserved proteins are A, B, C and G, which are involved in

regulation, and O and R, which are respectively responsible for chain length regulation and polymerization initiation; they shared more than 70% identity with *V. diabolicus* orthologs (Figure 2B). The A protein is an anti-sigma factor antagonist and a key regulator of biofilm formation; the deletion of A gene in *V. fischeri* (*sypA*) inhibits biofilm formation and thus squid colonization (Andrew R. Morris, Cynthia L. Darnell, & Karen L. Visick, 2011). The good conservation of both B and C proteins suggests they are important for the EPS biosynthesis, although their functions remain undetermined. D protein which functions as a chain length regulator (Satoshi Shibata, Emily S. Yip, Kevin P. Quirke, Jakob M. Ondrey, & Karen L. Visick, 2012) is conserved; an identity of about 50 % with that encoded by *V. diabolicus eps* cluster suggests that its activity can be variable (Figure 2B, Additional File 2).

The G gene, that codes for a σ^{54} -dependent activator of *syp* locus transcription in *A. fischeri*, is also conserved (Hussa, Darnell, & Visick, 2008; Andrew R. Morris & Karen L. Visick, 2013a, 2013b; Emily S. Yip, Kati Geszvain, Cindy R. DeLoney-Marino, & Karen L. Visick, 2006; Emily S. Yip, Brian T. Grublesky, Elizabeth A. Husa, & Karen L. Visick, 2005) (Figure 2B, Additional File 2). F, the other regulatory protein, is a hybrid sensor kinase which phosphorylates SypE and SypG in order to regulate biofilm formation in *V. fischeri* (Allison N. Norsworthy & Karen L. Visick, 2015; Emily S. Yip et al., 2005). F protein seems to be particularly subjected to variation (Figure 2B), as it appears truncated in *V. diabolicus eps* cluster, whereas some other species carry a full copy (Goudenège et al., 2014; Satoshi Shibata et al., 2012).

The *V. diabolicus eps* cluster encompasses 6 glycosyltransferases (GT), which biosynthesize the EPS repeating unit, and one priming GT (R), which initiates the EPS biosynthesis. Among the considered Vibrionaceae strains, 16 are lacking at least one of the *V. diabolicus* GTs. The most often observed difference is the absence of both I and J in 12 *eps* clusters (Figure 2A). I protein has only a weak role in the EPS production, adding a branch on the polysaccharide backbone late in the biosynthesis process (Satoshi Shibata et al., 2012). In addition, several GT genes are fragmented or annotated as pseudogenes. In *V. breoganii* FF50 and *V. haliotocoli*, the P, Q and R gene group is separated from the rest of the *eps* cluster by, respectively, a 60 Kb-long and a 5 kb-long sequence. Therefore, these genes may not be transcribed together with other *eps* genes. However, the PQR segment might be sufficient to synthesize some oligosaccharides, as in *A. fischeri*, the *syp PQR* segment constitutes an operon (Valerie A. Ray, Justin L. Eddy, Elizabeth A. Husa, Michael Misale, & Karen L. Visick, 2013). When present, H, I and J proteins display about 50 % identity with the corresponding *V. diabolicus* ones. N, P and Q are slightly more conserved (about 60% identity) suggesting only slight putative differences in substrate and acceptor specificities. P, Q and R proteins exhibit an overall very high conservation across Vibrionaceae. They have been hypothesized to be related to the repeating unit biosynthesis (Goudenège et al., 2014), which could thus likely be predicted to be rather similar in Vibrionaceae EPS.

The HE800 EPS export system involves the periplasmic protein Wza (C protein), the oligosaccharide translocase Wzx (K protein), the polymerase Wzy (L protein) and the putative polysaccharide biosynthesis chain length regulator Wzc (O protein). It has been previously established that K protein is essential for EPS repeating unit translocation across the inner membrane (Goudenège et al., 2014; Satoshi Shibata et al., 2012). But 15 of the *Vibrionaceae* studied species are devoid of this protein, suggesting that they are not able to produce, or at least export, an EPS molecule (Satoshi Shibata et al., 2012). L gene is absent in *E. calviensis*, and classified as pseudogene in *V. coralliilyticus*. Both genes K and L are absent in *V. nigrapulchritudo* (Figure 2A). In all these strains, if the biosynthesis of the repeating unit occurs, it may accumulate most likely in the cytosol. Indeed, the proteins encoded by their *eps* cluster do not enable the repeating unit to be translocated across the membrane nor polymerized (Goudenège et al., 2014; Whitfield, 2006a).

Between D and F genes, additional individual genes or a group of three genes were found in several of the studied *Vibrionaceae* (Figure 2A). One of these proteins (E) is homologous to *A. fischeri* SypE which is a two-component response regulator protein inhibiting SypG-mediated phenotypes and biofilm formation (Hussa et al., 2008). The other individual gene codes for a periplasmic component of an ABC type phosphate/phosphonate transport system (PABC). Phosphonates can be found as side groups on several macromolecules including polysaccharides (Villarreal-Chiu, Quinn, & McGrath, 2012). On the other hand, EPS are known to form a slime around cells to sequester several compounds and could therefore be involved in bioremediation. But it is not clear why only the PABC periplasmic component is present while some Gram-negative bacteria possess a full copy of the phosphonate biosynthetic operon beside EPS biosynthesis genes (Villarreal-Chiu et al., 2012). For eight of the strains studied, three genes, coding for an ABC transporter substrate-binding protein, a permease and a glycine betaine/L-proline ABC transporter ATP-binding protein (BET1, BET2 and BET3), are located between the genes D and F. As these proteins are homologous to the ProVWX components of the ProU transporter in *E. coli* K12 (Gul & Poolman, 2013), they may contribute to the uptake of glycine betaine which participates in bacterial osmoregulation, cryoprotection and protection against desiccation (Kapfhammer, Karatan, Pflughoeft, & Watnick, 2005). Betaine containing molecules can also constitute a source of phosphorus (Park, Buszko, & Gander, 1997). Several polysaccharides, especially the anionic ones, have been described to interact with glycine betaine compounds (Covis, Vives, Gaillard, Benoit, & Benvegna, 2015). The presence of such transporter within EPS biosynthetic clusters could suggest adaptation of the bacterial strain to specific environmental conditions.

E. corallii carries a glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT) between H and N genes. GFAT catalyzes the rate-limiting step in the synthesis of UDP-*N*-acetylglucosamine (Badet, Vermoote, & Le Goffic, 1988; Milewski, 2002) which is a precursor for both polysaccharide synthesis and cell

growth in *E. coli* (H. Yu & G. Stephanopoulos, 2008). Several transposase and integrase genes have been identified in *V. breoganii* and in *V. scopthalmi* VS-12. These proteins allow insertion of mobile elements and thus recombination events (Darmon & Leach, 2014; Polard & Chandler, 1995). The *syp* locus of *A. fischeri* encodes the additional SypM, an *O*-acetyltransferase, (Satoshi Shibata et al., 2012). It has also been identified in 52 strains over the 103 studied ones (M, Figure 2A). This could suggest the presence of *O*-acetyl groups in the final putative molecule.

Phylogenetic relationships

The MLSA phylogenetic tree (Figure 3B) shows congruence in the clustering of the large majority of strains with trees previously described (Sawabe et al., 2013). Concatenated proteins are generally clustered in the monophyletic clades (Figure 3A). However some exceptions are noticed. *V. natriegens* species and *V. sp.* EJY3 are the sole strains of the Harveyi clade which possess the PABC protein. PABC protein was found in 17 strains belonging to 6 different clades (Harveyi, Orientalis, Nereis, Mediterranei, Coralliilyticus and Vulnificus); these clades also encompass other members possessing *eps* cluster that does not encode this protein. *V. mytili* is the only Harveyi clade member (over 25) that does not share the *eps* cluster. The concatenated proteins of *V. nigripulchritudo* (Nigripulchritudo clade) appear isolated as they miss K and L proteins. *V. nigripulchritudo* is also the sole *Vibrio* to have E protein which is also found in *Fischeri*, *Enterovibrio* and *Phosphoreum* species. *V. vulnificus* and *V. mimicus* are the only representatives of the Vulnificus and Cholerae clades, respectively, sharing the *eps* cluster. Nevertheless, *V. mimicus* seems to be an atypical species of Cholerae clade (Davis et al., 1981; Gomez-Gil et al., 2014). All the 11 Splendidus clade species possess the *eps* cluster. Moreover, all studied species of seven clades examined (Coralliilyticus, Enterovibrio, Fischeri, Mediterranei, Nigripulchritudo, Scopthalmi, Splendidus) share the *eps* cluster. On the other hand, BET genes were found only in the Splendidus clade with the exception of *V. kanaloae* and *V. toranzoniae*.

Blast search on the NCBI genome sequence database ("NCBI Blast. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed April 2017,") excluding all Vibrionaceae species was used to infer the overall occurrence of the *eps* cluster. Only a few genomes contained homologs to the *eps* genes (Additional file 5). However, in these strains, the gene order is different, some gene blocks are inverted and differentially located on (+) and (-) DNA strands. In addition, several deletions/insertions are observed. The *eps* cluster examined in this paper thus appears as specific to Vibrionaceae and has likely been acquired by horizontal gene transfer in the few other bacteria sharing it.

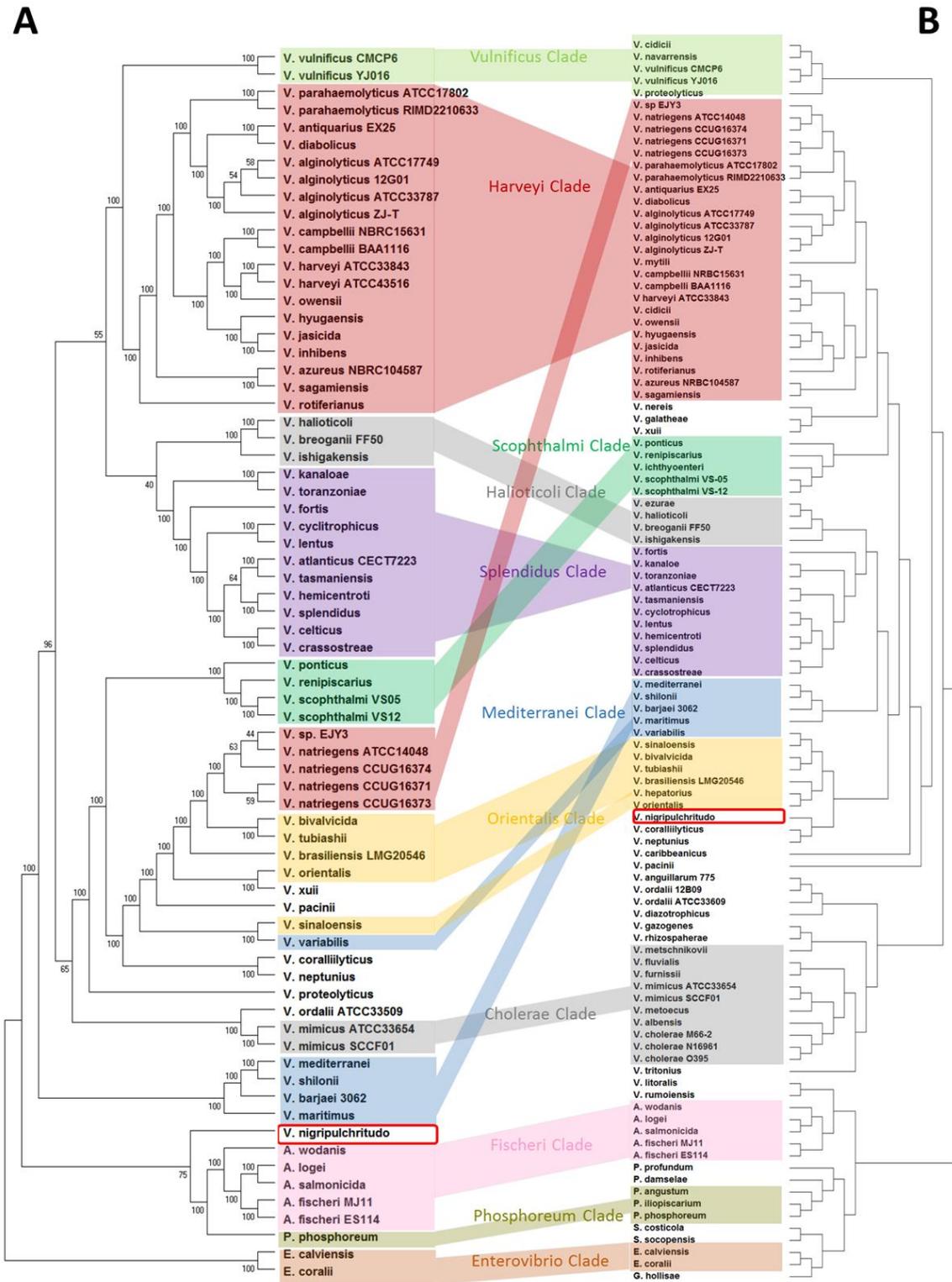


Figure 3: Evolutionary relationships of concatenated proteins encoded by *eps* gene clusters (A) and MLSA phylogenetic relationships between strains (B). Main monophyletic clades are also indicated in both trees.

Limitations

This identification of a large number of orthologous *eps* clusters within the Vibrionaceae is interesting to obtain EPS GAG-like molecules with distinct structural features. But it necessitates further studies by isolating and characterizing the putative EPS produced to gain insight into the EPS structural features. This is a challenge because EPS production conditions and regulation mechanisms are not fully understood. The characterization of a large number of EPS molecules together with the biosynthesis gene cluster structure would provide a relevant basis to identify the genetic mechanisms of the biosynthesis and open the field of synthetic biology to produce GAG-mimetics.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent to publish

Not applicable

Availability of data and materials

The data supporting this study are available on NCBI database and are included within the article and the additional files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Funding

This work is part of L. Lebellenger thesis supported with a fellowship from Ifremer and Région Pays de la Loire within the research network GlycoOuest.

Authors' contributions

LL and DP conceived and carried out the analysis; assembly downloads and BlastP searches were performed by CDL; LL, CDL and VVB wrote the original manuscript. CDL coordinated the study. All the authors have made substantial, direct and intellectual contribution to the work. They have also read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We acknowledge M. Dols-Lafargue and A. Zykwincka who kindly accepted to read the final manuscript.

References

1. Raguenes G, Christen R, Guezennec J, Pignet P, Barbier G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1997;47(4):989-95.
2. Rougeaux H, Kervarec N, Pichon R, Guezennec J. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr Res*. 1999;322(1-2):40-5.
3. Delbarre-Ladrat C, Siquin C, Lebellenger L, Zykwinska A, Collic-Jouault S. Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Front Chem*. 2014;2:85.
4. Zanchetta P, Lagarde N, Guezennec J. A new bone-healing material: A hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(1):74-9.
5. Senni K, Gueniche F, Changotade S, Septier D, Siquin C, Ratiskol J, Lutomski D, Godeau G, Guezennec J, Collic-Jouault S. Unusual glycosaminoglycans from a deep sea hydrothermal bacterium improve fibrillar collagen structuring and fibroblast activities in engineered connective tissues. *Mar Drugs*. 2013;11(4):1351-69.
6. Rederstorff E, Weiss P, Sourice S, Pilet P, Xie F, Siquin C, Collic-Jouault S, Guicheux J, Laïb S. An *in vitro* study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater*. 2011;7(5):2119-30.
7. Goudenège D, Boursicot V, Versigny T, Bonnetot S, Ratiskol J, Siquin C, LaPointe G, Le Roux F, Delbarre-Ladrat C. Genome sequence of *Vibrio diabolicus* and identification of the exopolysaccharide HE800 biosynthesis locus. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(24):10165-76.
8. NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed December 2016.
9. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform*. 2009;10(1):421.
10. Microscope. <https://microscope.readthedocs.io/en/latest/>. Accessed 18 July 2017.
11. NCBI Blast. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed April 2017.
12. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-9.
13. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406-25.
14. Sawabe T, Ogura Y, Matsumura Y, Gao F, Amin AR, Mino S, Nakagawa S, Sawabe T, Kumar R, Fukui Y *et al*. Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front Microbiol*. 2013;4:414.
15. Morris AR, Darnell CL, Visick KL. Inactivation of a novel response regulator is necessary for biofilm formation and host colonization by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*. 2011;82(1):114-30.
16. Shibata S, Yip ES, Quirke KP, Ondrey JM, Visick KL. Roles of the structural symbiosis polysaccharide (*syp*) genes in host colonization, biofilm formation, and polysaccharide biosynthesis in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*. 2012;194(24):6736-47.
17. Yip ES, Geszvain K, DeLoney-Marino CR, Visick KL. The symbiosis regulator RscS controls the *syp* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*. 2006;62(6):1586-600.
18. Hussa EA, Darnell CL, Visick KL. RscS functions upstream of SypG to control the *syp* locus and biofilm formation in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*. 2008;190(13):4576-83.
19. Yip ES, Grublesky BT, Hussa EA, Visick KL. A novel, conserved cluster of genes promotes symbiotic colonization and σ_{54} -dependent biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*. 2005;57(5):1485-98.

20. Morris AR, Visick KL. Inhibition of SypG-induced biofilms and host colonization by the negative regulator SypE in *Vibrio fischeri*. PLoS ONE. 2013;8(3):e60076.
21. Morris AR, Visick KL. The response regulator SypE controls biofilm formation and colonization through phosphorylation of the syp-encoded regulator SypA in *Vibrio fischeri*. Mol Microbiol. 2013;87(3):509-25.
22. Norsworthy AN, Visick KL. Signaling between two interacting sensor kinases promotes biofilms and colonization by a bacterial symbiont. Mol Microbiol. 2015;96(2):233-48.
23. Ray VA, Eddy JL, Husa EA, Misale M, Visick KL. The *syp* enhancer sequence plays a key role in transcriptional activation by the σ_{54} -dependent response regulator SypG and in biofilm formation and host colonization by *Vibrio fischeri*. J Bacteriol. 2013;195(23):5402-12.
24. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Annu Rev Biochem. 2006;75:39-68.
25. Villarreal-Chiu J, Quinn J, McGrath J. The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. Front Microbiol. 2012;3(19).
26. Gul N, Poolman B. Functional reconstitution and osmoregulatory properties of the ProU ABC transporter from *Escherichia coli*. Molec Membrane Biol. 2013;30(2):138-48.
27. Kapfhammer D, Karatan E, Pflughoeft KJ, Watnick PI. Role for Glycine Betaine Transport in *Vibrio cholerae* Osmoadaptation and Biofilm Formation within Microbial Communities. Appl Environ Microbiol. 2005;71(7):3840-7.
28. Park YI, Buszko ML, Gander JE. Utilization of phosphocholine from extracellular complex polysaccharide as a source of cytoplasmic choline derivatives in *Penicillium fellutanum*. J Bacteriol. 1997;179(4):1186-92.
29. Covis R, Vives T, Gaillard C, Benoit M, Benvegna T. Interactions and hybrid complex formation of anionic algal polysaccharides with a cationic glycine betaine-derived surfactant. Carbohydr Polym. 2015;121:436-48.
30. Badet B, Vermoote P, Le Goffic F. Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N3-fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. Biochemistry. 1988;27(7):2282-7.
31. Milewski S. Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. Biochim Biophys Acta. 2002;1597(2):173-92.
32. Yu H, Stephanopoulos G. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. Metab Eng. 2008;10(1):24-32.
33. Polard P, Chandler M. Bacterial transposases and retroviral integrases. Mol Microbiol. 1995;15(1):13-23.
34. Darmon E, Leach DRF. Bacterial Genome Instability. Microbiol Mol Biol Rev. 2014;78(1):1-39.
35. Davis BR, Fanning GR, Madden JM, Steigerwalt AG, Bradford HB, Smith HL, Brenner DJ. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. J Clin Microbiol. 1981;14(6):631-9.
36. Gomez-Gil B, Thompson CC, Matsumura Y, Sawabe T, Iida T, Christen R, Thompson F, Sawabe T. The Family Vibrionaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. The Prokaryotes - Gammaproteobacteria, 4th Edition. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag. 2014:p. 659-747.

Additional Files

Les fichiers supplémentaires 2 et 4 n'ont pas été rajoutés à ce mémoire.

Additional File 2: Proteins encoded by *eps* orthologous clusters in Vibrionaceae. Lines in green (*E. coralii*, *V. breoganii* FF50 and *V. ichthyoenteri*): clusters with specific genes as indicated, Lines in red (*V. ishigakensis*, *V. maritimus*, *V. ponticus*): strains with replicated genes. Locus tags annotated as pseudogene are also identified (XLSX, 95 KB).

Additional File 4: List of strains and sequence accession numbers used for the MLSA (multilocus sequence analysis) (XLSX, 20 KB).

Additional File 1: List of strains studied. The assembly reference is indicated as well as clades.

Assembly Accession	Assembly Date	Used abbreviation	Genome	Strain	Type	Clade	Assembly level	eps cluster
1 ASM1180v1	02/04/2008	<i>A. fischeri</i> _ES114	<i>Aliivibrio fischeri</i>	ES114		Fischeri	whole genome	Y
2 ASM2084v1	28/08/2008	<i>A. fischeri</i> _MU11	<i>Aliivibrio fischeri</i>	MU11		Fischeri	whole genome	Y
3 ASM169105v1	21/07/2016	<i>A. loeigi</i>	<i>Aliivibrio loeigi</i>	15159		Fischeri	scaffolds	Y
4 ASM19649v1	01/10/2008	<i>A. salmonicida</i>	<i>Aliivibrio salmonicida</i>	LF11238		Fischeri	whole genome	Y
5 AWOD1	30/09/2014	<i>A. wodonis</i>	<i>Aliivibrio wodonis</i>	AWOD1		Fischeri	whole genome	Y
6 ASM62116v1	08/04/2014	<i>E. calviensis</i>	<i>Enterovibrio calviensis</i>	LMG 21294=DSM 14347	T	Enterovibrio	scaffolds	Y
7 CAIM912T_1	11/02/2016	<i>E. coralli</i>	<i>Enterovibrio coralli</i>	LMG 22228=CAIM 912	T	Enterovibrio	contigs	Y
8 ASM155825v1	11/02/2016	<i>G. hollisiae</i>	<i>Grimontia hollisiae</i>	LMG 17719=ATCC 33564	T	Grimontia	whole genome	N
9 ASM15326v1	29/06/2006	<i>P. angustum</i>	<i>Photobacterium angustum</i>	S14		Phosphoreum	scaffolds	N
10 ASM17679v1	13/11/2009	<i>P. damsela</i>	<i>Photobacterium damsela</i> subsp.	LMG 7892=CIP 102761	T	Damsela	scaffolds	N
11 CFSAN029430_01.0	10/03/2015	<i>P. illopicarium</i>	<i>Photobacterium illopicarium</i>	ATCC 51761		Phosphoreum	contigs	N
12 BDW_PJIEB5262	22/04/2015	<i>P. phosphoreum</i>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	ANT-2200		Phosphoreum	scaffolds	Y
13 ASM19625v1	17/05/2004	<i>P. profundum</i>	<i>Photobacterium profundum</i>	SS9		Profundum	scaffolds	N
14 costicolaLMG11651	07/01/2014	<i>S. costicola</i>	<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. <i>costicola</i>	LMG 11651=ATCC 33508	T	Salinivibrio	contigs	N
15 SaliniS108	07/01/2014	<i>S. scampensis</i>	<i>Salinivibrio scampensis</i>	S108		Salinivibrio	contigs	N
16 ASM51814v1	13/01/2014	<i>V. albensis</i>	<i>Vibrio albensis</i>	LMG 4406=ATCC 14547	T	Cholerae	scaffolds	N
17 ASM35417v2	10/09/2013	<i>V. alginolyticus</i> ATCC17749	<i>Vibrio alginolyticus</i>	LMG 4409=ATCC 17749=NBRC 15630	T	Harveyi	whole genome	Y
18 ASM146973v1	09/12/2015	<i>V. alginolyticus</i> ATCC33787	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 33787		Harveyi	whole genome	Y
19 ASM167974v1	05/07/2016	<i>V. alginolyticus</i> ZI-T	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ZI-T		Harveyi	whole genome	Y
20 ASM15350v1	29/06/2006	<i>V. alginolyticus</i> 12G01	<i>Vibrio alginolyticus</i>	12G01		Harveyi	scaffolds	Y
21 ASM21767v1	09/06/2011	<i>V. anguillarum</i> 775	<i>Vibrio anguillarum</i>	775		Anguillarum	whole genome	N
22 ASM2482v1	03/11/2009	<i>V. anguillarum</i> EX25	<i>Vibrio anguillarum</i>	EX25		Harveyi	whole genome	Y
23 VatlanticusCECT7223_Velvet_Prokka	16/07/2016	<i>V. atlanticus</i> CECT7223	<i>Vibrio atlanticus</i>	LMG 24300=CECT 7223	T	Splendidus	scaffolds	Y
24 ASM0026v1	15/05/2013	<i>V. azureus</i> NBRC104587	<i>Vibrio azureus</i>	LMG 25266=NBRC 104587=KCTC 22352	T	Harveyi	contigs	Y
25 ASM163906v2	07/11/2016	<i>V. barjaei</i> 3062	<i>Vibrio barjaei</i>		3062	Mediterranei	contigs	Y
26 ASM139945v2	17/05/2016	<i>V. bivalvicida</i>	<i>Vibrio bivalvicida</i>	605		Orientalis	scaffolds	Y
27 ASM18925v1	11/02/2011	<i>V. brasiliensis</i> LMG20546	<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546		Orientalis	contigs	Y
28 ASM16772Fv1	28/06/2016	<i>V. breoganii</i> FF50	<i>Vibrio breoganii</i>	FF50		Haliotocoli	whole genome	Y
29 ASM1770v1	28/08/2007	<i>V. campbellii</i> BAA1116	<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC BAA-1116=BB120		Harveyi	whole genome	Y
30 ASM0034v1	15/05/2013	<i>V. campbellii</i> NBRC15631	<i>Vibrio campbellii</i>	LMG 11216=ATCC 25920=CAIM519=NB	T	Harveyi	contigs	Y
31 Vcar_1.0	20/10/2010	<i>V. caribbeanicus</i>	<i>Vibrio caribbeanicus</i>	ATCC BAA-2122=DSM 23640	T	Pectenicida	contigs	N
32 VceliticusCECT7224_Velvet_Prokka	17/07/2016	<i>V. celiticus</i>	<i>Vibrio celiticus</i>	LMG 23850=RD 8.15=CECT 7224	T	Splendidus	scaffolds	Y
33 ASM2160v1	20/04/2009	<i>V. cholerae</i> M66-2	<i>Vibrio cholerae</i> M66-2	M66-2		Cholerae	whole genome	N
34 ASM674v1	09/01/2001	<i>V. cholerae</i> N16961	<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor strain N16961	N16961		Cholerae	whole genome	N
35 ASM1624v1	08/05/2007	<i>V. cholerae</i> O395	<i>Vibrio cholerae</i> O395	O395		Cholerae	whole genome	N
36 ASM159765v1	25/02/2016	<i>V. cidici</i>	<i>Vibrio cidici</i>	LMG 29267=2756-81	T	Vulnificus	whole genome	Y
37 ASM76353v2	28/10/2014	<i>V. corallilyticus</i>	<i>Vibrio corallilyticus</i>	OCN014		Corallilyticus	whole genome	Y
38 Evh12	15/12/2015	<i>V. crassostreae</i>	<i>Vibrio crassostreae</i>	Evh12		Splendidus	scaffolds	Y
39 HGAP	30/09/2013	<i>V. cyslitrophus</i>	<i>Vibrio cyslitrophus</i>	FF75		Splendidus	scaffolds	Y
40 VDIABv1_PJIEB5898	30/06/2015	<i>V. diabolus</i>	<i>Vibrio diabolus</i>	LMG 19805=CNMCI 1-1629	T	Harveyi	contigs	Y
41 ASM74001v1	02/08/2014	<i>V. diazotrophicus</i>	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	NBRC 103148		Diazotrophicus	contigs	N
42 ASM64718v1	13/09/2013	<i>V. ezrae</i>	<i>Vibrio ezrae</i>	NBRC 102218		Haliotocoli	contigs	N
43 ASM155841v1	11/02/2016	<i>V. fluvialis</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	LMG 7894=ATCC 33809		Cholerae	whole genome	N
44 Soap denovo 2.01	23/05/2014	<i>V. fortis</i>	<i>Vibrio fortis</i>	Dalian 14		Splendidus	scaffolds	Y
45 ASM18432v1	17/12/2010	<i>V. furnissii</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	NCTC 11218		Cholerae	whole genome	N
46 S2757	01/04/2015	<i>V. galathea</i>	<i>Vibrio galathea</i>	S2757		Unknown	contigs	N
47 LMG-taxon 2582581274 annotated assembly	03/12/2016	<i>V. gazogenes</i>	<i>Vibrio gazogenes</i>	LMG 19540=DSM 21264=ATCC 29988=	T	Gazogenes	scaffolds	N
48 ASM9669v1	05/11/2013	<i>V. halotocoli</i>	<i>Vibrio halotocoli</i>	LMG 18542=NBRC 102217=ATCC 70068	T	Haliotocoli	contigs	Y
49 ASM77011v2	05/12/2014	<i>V. harveyi</i> ATCC33843	<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 11226=ATCC 33843=392 [MAV]		Harveyi	whole genome	Y
50 ASM155843v1	11/02/2016	<i>V. harveyi</i> ATCC3516	<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 11755=ATCC 43516		Harveyi	whole genome	Y
51 VhemientrotiCECT8714_SPAdes_Prokka	17/07/2016	<i>V. hemientroti</i>	<i>Vibrio hemientroti</i>	CECT 8714		Splendidus	contigs	Y
52 ASM127478v1	26/08/2015	<i>V. hepatarius</i>	<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362=DSM 19134	T	Orientalis	contigs	N
53 ASM81843v1	09/01/2015	<i>V. hyuagensis</i>	<i>Vibrio hyuagensis</i>	090810a		Harveyi	contigs	Y
54 ASM22260v1	04/08/2011	<i>V. ichtyophenteri</i>	<i>Vibrio ichtyophenteri</i>	LMG 19664=ATCC 700023	T	Scophthalmi	contigs	Y
55 VICECT7692_1.0	13/04/2016	<i>V. inhibens</i>	<i>Vibrio inhibens</i>	BFLP-10		Harveyi	scaffolds	Y
56 ASM83043v1	30/01/2015	<i>V. ishigakensis</i>	<i>Vibrio ishigakensis</i>	JCM19232		Haliotocoli	contigs	Y
57 ASM81871v1	09/01/2015	<i>V. jascida</i>	<i>Vibrio jascida</i>	200612G		Harveyi	scaffolds	Y
58 ASM27216v2	16/09/2016	<i>V. kanaloe</i>	<i>Vibrio kanaloe</i>	SS-149		Splendidus	scaffolds	Y
59 ASM123847v1	05/08/2015	<i>V. lentus</i>	<i>Vibrio lentus</i>	BSW13		Splendidus	contigs	Y
60 ASM2676v1	11/07/2013	<i>V. littoralis</i>	<i>Vibrio littoralis</i>	DSM 17657=MANO22D	T	Rumoinensis	scaffolds	N
61 ASM75538v1	12/09/2014	<i>V. maritimus</i>	<i>Vibrio maritimus</i>	JCM 19235		Mediterranei	contigs	Y
62 ASM159112v1	23/02/2016	<i>V. mediterranei</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	LMG 11258=NBRC 15635=CAIM316	T	Mediterranei	contigs	Y
63 ASM140216v1	22/10/2015	<i>V. metoecus</i>	<i>Vibrio metoecus</i>	07-2435		Cholerae	contigs	N
64 ASM17615v1	06/10/2009	<i>V. metschnikovii</i>	<i>Vibrio metschnikovii</i>	LMG 11664=CIP 69-14	T	Cholerae	contigs	N
65 ASM155847v1	11/02/2016	<i>V. mimicus</i> ATCC33654	<i>Vibrio mimicus</i>	ATCC 33654		Cholerae	whole genome	Y
66 ASM176735v1	18/10/2016	<i>V. mimicus</i> SCCF01	<i>Vibrio mimicus</i>	SCCF01		Cholerae	whole genome	Y
67 ASM83050v1	30/01/2015	<i>V. mytili</i>	<i>Vibrio mytili</i>	LMG 19157=ATCC 51288=CAIM 528	T	Harveyi	contigs	N
68 ASM168002v1	06/07/2016	<i>V. natriegens</i> ATCC14048	<i>Vibrio natriegens</i>	LMG 10935=ATCC 14048=NBRC 15636	T	Harveyi	whole genome	Y
69 ASM168004v1	06/07/2016	<i>V. natriegens</i> CCUG16371	<i>Vibrio natriegens</i>	CCUG 16371		Harveyi	whole genome	Y
70 ASM168006v1	06/07/2016	<i>V. natriegens</i> CCUG16373	<i>Vibrio natriegens</i>	CCUG 16373		Harveyi	whole genome	Y
71 ASM168008v1	06/07/2016	<i>V. natriegens</i> CCUG16374	<i>Vibrio natriegens</i>	LMG 11666=CCUG 16374		Harveyi	whole genome	Y
72 2540-90v1.0	07/10/2014	<i>V. navarrensis</i>	<i>Vibrio navarrensis</i>	LMG 15976=ATCC 51183	T	Vulnificus	contigs	N
73 S2394	01/04/2015	<i>V. neptunius</i>	<i>Vibrio neptunius</i>	S2394		Corallilyticus	contigs	Y
74 ASM127480v1	26/08/2015	<i>V. nereis</i>	<i>Vibrio nereis</i>	LMG 3895=DSM 19584	T	Nereis	contigs	N
75 ASM80127v1	01/10/2013	<i>V. nigripulchritudo</i>	<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	SFn1		Nigripulchritudo	whole genome	Y
76 ASM25720v1	22/06/2011	<i>V. ordalii</i> ATCC33509	<i>Vibrio ordalii</i>	LMG 13544=ATCC 33509	T	Anguillarum	contigs	Y
77 ASM28713v2	16/09/2016	<i>V. ordalii</i> 12B09	<i>Vibrio ordalii</i>	12B09		Anguillarum	scaffolds	N
78 ASM17623v1	09/10/2009	<i>V. orientalis</i>	<i>Vibrio orientalis</i>	LMG 7897=ATCC 33934	T	Orientalis	scaffolds	Y
79 ASM82973v1	06/12/2014	<i>V. owensii</i>	<i>Vibrio owensii</i>	GRA50-12		Harveyi	scaffolds	Y
80 ASM71179v1	25/06/2014	<i>V. pacinii</i>	<i>Vibrio pacinii</i>	LMG 19999=DSM 19139	T	Unknown	scaffolds	Y
81 ASM19609v1	11/05/2004	<i>V. parahaemolyticus</i> RIMD2210633	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210633		Harveyi	whole genome	Y
82 ASM155849v1	11/02/2016	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	LMG 2850=ATCC 17802	T	Harveyi	whole genome	Y
83 ASM75415v1	11/09/2014	<i>V. ponticus</i>	<i>Vibrio ponticus</i>	JCM 19238		Scophthalmi	contigs	Y
84 ASM64712v1	13/09/2013	<i>V. proteolyticus</i>	<i>Vibrio proteolyticus</i>	LMG 3772=NBRC 13287	T	Orphan	contigs	Y
85 ASM82788v1	23/01/2015	<i>V. renipiscarius</i>	<i>Vibrio renipiscarius</i>	DCR 1-4-2	T	Scophthalmi	scaffolds	Y
86 ASM71180v1	25/06/2014	<i>V. rhizopherae</i>	<i>Vibrio rhizopherae</i>	LMG 23790=DSM 18581	T	Gazogenes	scaffolds	N
87 ASM40040v1	15/05/2013	<i>V. rotiferianus</i>	<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460=CAIM 577	T	Harveyi	contigs	Y
88 ASM28695v2	16/09/2016	<i>V. rumoinensis</i>	<i>Vibrio rumoinensis</i>	15-45		Rumoinensis	scaffolds	N
89 ASM40042v1	15/05/2013	<i>V. sagamiensis</i>	<i>Vibrio sagamiensis</i>	NBRC 104589		Harveyi	contigs	Y
90 ASM168546v1	15/07/2016	<i>V. scophthalmi</i> VS-12	<i>Vibrio scophthalmi</i>	VS-12		Scophthalmi	whole genome	Y
91 ASM168780v1	20/07/2016	<i>V. scophthalmi</i> VS-05	<i>Vibrio scophthalmi</i>	VS-05		Scophthalmi	whole genome	Y
92 ASM18153v1	14/06/2007	<i>V. shilonii</i>	<i>Vibrio shilonii</i>	LMG 19703=AK1	T	Mediterranei	contigs	Y
93 ASM18927v1	11/02/2011	<i>V. sinaloensis</i>	<i>Vibrio sinaloensis</i>	DSM 21326		Orientalis	contigs	Y
94 ASM24138v1	05/01/2012	<i>V. sp. EJY3</i>	<i>Vibrio sp. EJY3</i>	EJY3		Harveyi	whole genome	Y
95 ASM15276v1	04/05/2006	<i>V. splendidus</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	12B01		Splendidus	scaffolds	Y
96 ASM9146v1	13/02/2009	<i>V. tasmaniensis</i>	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LGP32		Splendidus	whole genome	Y
97 VtoranzoniaeCECT7225_SPAdes_Prokka	28/06/2016	<i>V. toranzoniae</i>	<i>Vibrio toranzoniae</i>	CECT 7225	T	Splendidus	contigs	Y
98 ASM154793v1	11/09/2015	<i>V. tritonis</i>	<i>Vibrio tritonis</i>	LMG 25401=JCM 16456=AIM2	T	Porteresiae	whole genome	N
99 ASM77210v1	05/11/2014	<i>V. tubiashii</i>	<i>Vibrio tubiashii</i>	LMG 10936=ATCC 19109	T	Orientalis	whole genome	Y
100 ASM78332v1	14/11/2014	<i>V. variabilis</i>	<i>Vibrio variabilis</i>	T01		Mediterranei	contigs	Y
101 ASM9976v1	25/01/2011	<i>V. vulnificus</i> CMCP6	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	CMCP6		Vulnificus	whole genome	Y
102 ASM974v1	03/10/2003	<i>V. vulnificus</i> YJ016	<i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	YJ016		Vulnificus	whole genome	Y
103 ASM127485v1	26/08/2015	<i>V. xuii</i>	<i>Vibrio xuii</i>	LMG 21346=DSM 17185	T	Nereis	contigs	Y

IV. Conclusion

Les informations collectées, et l'analyse de la distribution et de la variabilité de ce cluster ont permis de préciser son histoire phylogénétique. La richesse en G+C des loci identifiés a été vérifiée, elle était similaire à celle des génomes des souches correspondantes. La similarité des clusters *eps* identifiés au sein des souches étudiées, basée sur leur syntènie et le haut niveau de conservation de la séquence des protéines correspondantes, suggère l'existence d'un ancêtre commun pour les Vibrionaceae, doté d'un cluster *eps* orthologue. Le cluster *eps* n'aurait pas été acquis horizontalement par les souches étudiées, ou en tout cas par récemment, comme le suggèrent Lawrence et Ochman (Lawrence & Ochman, 1997).

Cependant, le cluster *eps* a pu diverger dans chaque souche par la spéciation et / ou un transfert horizontal associé à une recombinaison (comme *V. natriegens* peut-être).

Un cluster *eps* a été identifié chez 70 % des génomes étudiés, suggérant son importance pour une adaptation à une niche écologique. Les Vibrionaceae sont très représentés au sein des océans (Thompson, Iida, & Swings, 2004). Certaines populations vivent librement, beaucoup ont été isolés d'animaux, de zooplancton, de particules suspendues à la surface (Carli, Pane, Casareto, Bertone, & Pruzzo, 1993; Dunn, 2012; Hasan et al., 2015; Le Roux, Wegner, & Polz, 2016; G. Ragueneas et al., 1997b; Vezzulli et al., 2008; Yoshizawa et al., 2012), et de biofilms (Hansen et al., 2014; Henares, Xu, & Boon, 2013; Kavita, Mishra, & Jha, 2013; Tercero-Albuero, Gonzalez-Marquez, Bonilla-Gonzalez, Quinones-Ramirez, & Vazquez-Salinas, 2014). Les Vibrionaceae sont souvent associés à des pathogénies touchant les animaux (LeRoux et al., 2015). Une communauté de *Vibrio* en association avec l'algue *Caulerpa cylindraceae* a été décrite (Rizzo, Frascchetti, Alifano, Tredici, & Stabili, 2016). *A. fischeri*, grâce au cluster *syp*, produit un biofilm qui lui permet de coloniser l'organe lumineux des calmars *Euprymna tasmanica*, *E. morsei* et *E. scolopes* (Chavez-Dozal, Hogan, Gorman, Quintanal-Villalonga, & Nishiguchi, 2012; Ruby & Lee, 1998; Yip et al., 2005). Il est possible qu'un polysaccharide, dont la biosynthèse reposerait sur un cluster *eps*, participe à l'adhésion, à la formation d'un biofilm, à l'établissement de symbiose avec un hôte, chez les Vibrionaceae. En raison de leur vaste distribution, il est difficile d'établir des liens entre leur phylogénie et leur habitat.

Cette étude a également permis la découverte de potentiels producteurs d'EPS. Ainsi, l'identification de clusters génétiques est une première étape vers la découverte ciblée d'EPS. La seconde étape serait d'étudier la molécule produite, de la purifier et d'analyser sa structure chimique. *V. diabolicus* est ainsi la seule bactérie pour laquelle on connaît la structure chimique fine de l'EPS qu'elle produit et son cluster génétique de biosynthèse (Goudenege et al., 2014).

Chapitre 2 : Etude du mécanisme de biosynthèse de l'exopolysaccharide HE800 chez *Vibrio diabolicus* : approche transcriptomique

Une analyse des transcrits par RNA-Seq a été réalisée chez *V. diabolicus*, afin de mettre en évidence les voies de biosynthèse utilisées lors de la synthèse de l'EPS HE800. Les profils transcriptionnels de *V. diabolicus* placé dans deux conditions de culture différentes, l'une stimulant la production d'EPS, l'autre non, ont été comparés.

I. Choix des conditions de culture

Le choix du milieu, du substrat et le moment de l'échantillonnage ont été validés par des expériences préliminaires.

A. Choix du milieu et du substrat.

Le milieu ZPHUF est tamponné grâce à l'HEPES et le PIPES ; de plus il contient de l'extrait de levure ultrafiltré, moins riche en sucres monomères que l'extrait de levure classique, ce qui limite l'induction d'EPS non souhaitée. *V. diabolicus* a été cultivé dans ce milieu supplémenté en différentes sources de carbone à la teneur de 30 g/L. Des sucres en C5 (ribose, fructose, arabinose et xylose), en C6 (mannose, rhamnose et glucose) ainsi que du mannitol ont été testés.

L'évolution de la croissance a été suivie par lecture de l'absorbance à 620 nm, et celle de la synthèse de l'EPS par électrophorèse sur gel d'agarose du surnageant de la culture, suivies de colorations au Stains-All. Les prélèvements ont été effectués toutes les 24h pendant 96h.

L'EPS n'était pas, ou peu synthétisé, lorsque la source carbonée était le xylose, l'arabinose ou le rhamnose. La production d'EPS la plus visible a été obtenue avec le glucose, ce sucre a donc été retenu comme substrat.

B. Choix du moment des prélèvements.

Cette expérience a permis de déterminer la durée de culture appropriée pour la comparaison des transcriptomes de *V. diabolicus*, en condition non productrice et productrice d'HE800.

Des cultures de *V. diabolicus* ont été réalisées en milieu ZPHUF, à 30°C, sous agitation, en triplicata selon la condition non productrice ou productrice. Pour chaque culture, une pré-culture a été préalablement réalisée. Trois cultures ont été supplémentées en glucose, à la teneur de 30 g/L, afin d'être placées en condition productrice (échantillons 1-G, 2-G et 3-G), les trois cultures témoins n'ont reçu aucune supplémentation afin d'être en condition non productrice (1-E, 2-E et 3-E).

Des prélèvements ont été effectués sur ces cultures, au bout de 6, 10 et 26 heures d'incubation, afin de suivre la croissance bactérienne et la production d'EPS. La croissance a été évaluée par mesure de la turbidité à 620 nm, et la production d'EPS par électrophorèses en gel d'agarose, suivies de colorations au Stains-All.

Le suivi de croissance a révélé l'évolution similaire des triplicatas, selon la condition fixée (Figure 19). L'absorbance des cultures supplémentées en glucose était supérieure à celle des cultures témoins (sans glucose). Cette variation de turbidité observée est probablement due à une différence de croissance en présence de glucose, mais peut-être également à la synthèse de l'exopolysaccharide HE800 dans le milieu extracellulaire.

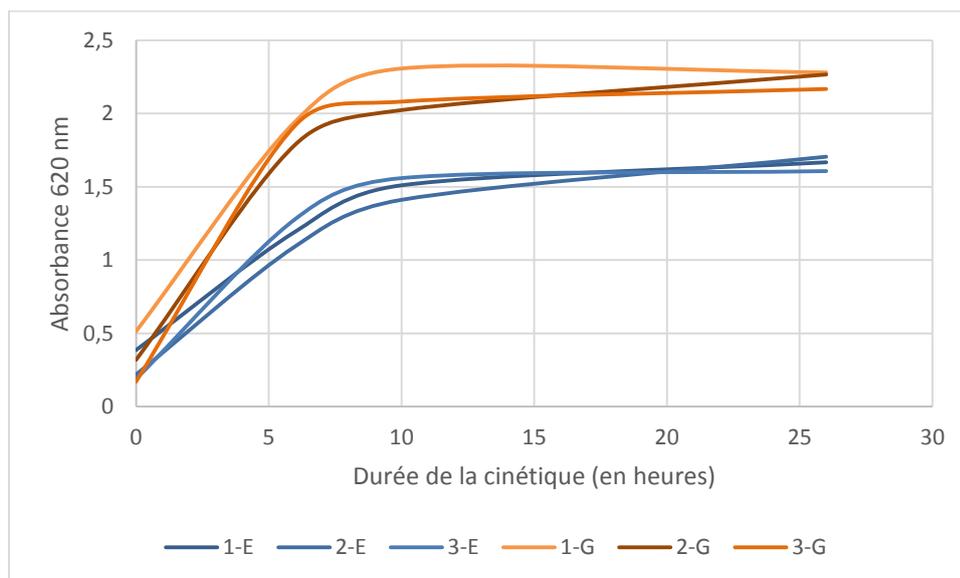


Figure 19 : Courbes de croissance des cultures effectuées en triplicatas pour chaque condition ; en absence de glucose (1-E, 2-E, 3-E) et en présence de glucose (1-G, 2-G, 3-G).

En ce qui concerne le suivi de la synthèse d'EPS, une légère production a été observée à partir de 6 heures de culture avec le glucose (Figure 20 A), et au bout de 26 heures de culture sans glucose (Figure 20 B). Les prélèvements effectués au bout de 10 heures de culture ont été retenus pour l'analyse RNA-seq. C'est à ce moment que la synthèse d'EPS semble la plus importante en présence de glucose, tandis qu'il ne semble pas y avoir de production en absence de sucre (ce n'est plus vrai au bout de 26 heures).

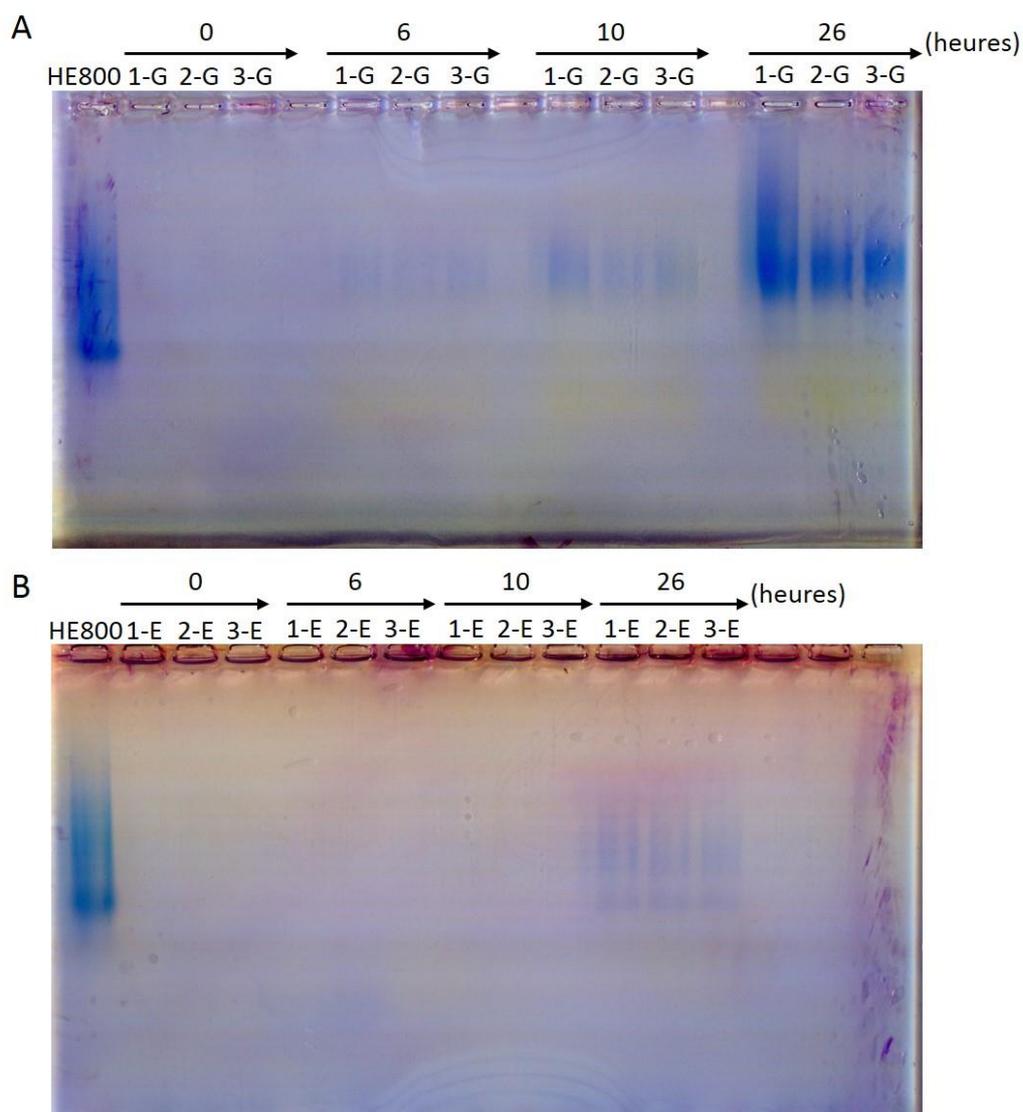


Figure 20 : Production d'EPS par *V. diabolicus* au bout de 6, 10 et 26 heures de culture en présence de glucose (A), et sans glucose (B). 1, 2 et 3 sont des triplicats. De l'HE800 a été déposé comme témoin positif.

II. Traitement des échantillons

Avant d'être soumis au séquençage, la pureté et l'intégrité des ARN extraits ont été évaluée.

A. Pureté des ARN

Les échantillons ont été traités à la DNase I, pour purification. Afin de vérifier cette étape, ils ont ensuite été soumis à une amplification avec les amorces correspondant à l'ADNr16S (Tableau IV). Une amplification a été obtenue pour deux échantillons, ils ont donc été traités une seconde fois à la DNase I et revérifiés.

B. Qualité des ARN

Tous les RIN (Rna Integrity Number) étaient à 10, les ARN extraits étaient donc de bonne qualité, et ont été conservés pour les étapes suivantes (Figure 21).

Electropherogram Summary

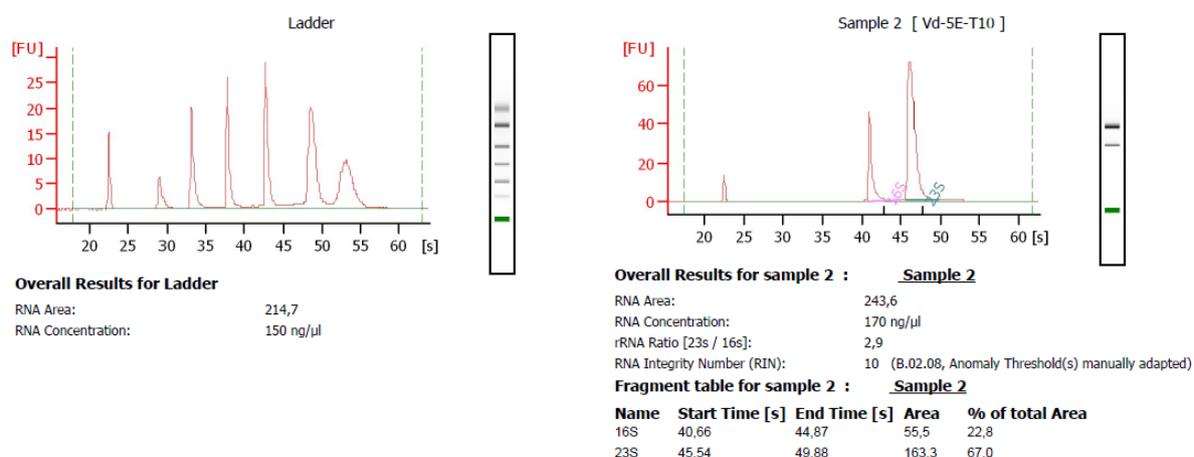


Figure 21 : Exemple d'électrophorégramme et de gel synthétique obtenus après séparation d'un extrait d'ARN (correspondant à l'un des 6 échantillons analysés dans cette étude) avec le Bioanalyzer 2100 (Agilent) montrant l'analyse d'un ARN d'excellente qualité avec un RIN (RNA Integrity Number) de 10 (valeur maximale possible).

III. Analyse transcriptomique

Les résultats obtenus ont mis en évidence un transcriptome de 5161 gènes, parmi lesquels 194 gènes ont été identifiés comme différentiellement exprimés, en fonction de la présence ou non de glucose dans le milieu de culture. En présence de glucose, 102 gènes sont exprimés au moins

2 fois plus (Tableau VI), et 92 le sont au moins 2 fois moins par rapport au témoin sans glucose (Tableau VII).

Tableau VII : Ensemble des gènes exprimés au moins 2 fois plus en présence de glucose chez *V. diabolicus*. La colonne COG comporte des lettres servant à classifier la fonction attribuée à chaque gène (procédé COG). C, E, G, H, I, P et Q correspondent au métabolisme, M, N, O, T, U et V correspondent aux procédés cellulaires et la signalisation, K et L aux stockage et traitement de données, R et S sont peu caractérisés. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

nom gène	log2fdc	COG	description	procédé COG
VDIABv1_100558	11,5	Q	Transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1_100557	11,1	Q	Transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1_100555	10,4	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1_220223	10,3		Non caractérisé	
VDIABv1_100556	9,9	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1_100984	9,1	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_110354	8,7	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_100983	8,1	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_100224	8,0	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_250258	7,7	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1_100982	7,6	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_100108	7,6	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1_110158	7,6	M	synthèse de parois et de membranes	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1_100989	7,5	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1_30276	7,4		Non caractérisé	
VDIABv1_110353	7,3	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_110424	7,3	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1_100107	7,3	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_100783	7,2	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_270567	6,8		Non caractérisé	
VDIABv1_110352	6,6	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1_110029	6,6	C	production et conversion d'énergie	métabolisme

VDIABv1 _100109	6,4	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _100988	6,4	H	métabolisme et transport de coenzymes	métabolisme
VDIABv1 _110028	6,4	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _250257	6,3	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _110027	6,2	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100889	6,2	K	Transcription	stockage et traitement de données
VDIABv1 _270677	6,1	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _110351	6,0	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _110066	5,9	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _110030	5,8		Non caractérisé	
VDIABv1 _30277	5,7	L	réplication, recombinaison et réparation	stockage et traitement de données
VDIABv1 _100888	5,7	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _30315	5,4	T	mécanismes de transduction du signal	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _100890	5,4	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100084	5,3		Non caractérisé	
VDIABv1 _110520	5,3	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _220113	5,2		Non caractérisé	
VDIABv1 _100980	5,0	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _100422	5,0	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _110337	4,9	Q	Transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _100102	4,8	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _270485	4,7	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100981	4,6	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _270594	4,6	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _230098	4,6	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _110025	4,6	O	modifications post-traductionnelles, renouvellement de protéines, synthèse de protéines chaperonnes	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _100985	4,5	T	mécanismes de transduction du signal	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _110518	4,5	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _30273	4,5	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _100220	4,4	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme

VDIABv1 _30136	4,4	I	Métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _110606	4,3	S	fonctions inconnues	peu caractérisé
VDIABv1 _100101	4,3	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _100925	4,2		Non caractérisé	
VDIABv1 _100100	4,2	S	fonctions inconnues	peu caractérisé
VDIABv1 _240074	4,2	N	mobilité cellulaire	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _110283	4,1	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _30137	4,1	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _220096	4,1	Q	Transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _100707	4,1	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100223	4,1	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _271186	4,0		Non caractérisé	
VDIABv1 _110730	4,0	V	mécanismes de défense	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _110731	4,0	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110401	4,0	P	métabolisme et transports d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _100221	3,9	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110285	3,9	M	synthèse de parois et de membranes	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _110224	3,9	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _270258	3,9	N	mobilité cellulaire	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _30152	3,9	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100933	3,9	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _270825	3,8	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _270303	3,8	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110339	3,8	K	Transcription	stockage et traitement de données
VDIABv1 _110026	3,7	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _110291	3,7	M	synthèse de parois et de membranes	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _110059	3,7	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100708	3,7	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _270676	3,7	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _110287	3,6	M	synthèse de parois et de membranes	procédés cellulaires et signalisation

VDIABv1					
_110541	3,6		Non caractérisé		
VDIABv1					stockage et traitement de données
_100118	3,6	K	Transcription		
VDIABv1					métabolisme
_100123	3,6	E	métabolisme et transport d'amino-acides		
VDIABv1					stockage et traitement de données
_270888	3,6	K	Transcription		
VDIABv1					peu caractérisé
_270792	3,5	R	fonctions générales		
VDIABv1					métabolisme
_270082	3,5	E	métabolisme et transport d'amino-acides		
VDIABv1					procédés cellulaires et signalisation
_110289	3,4	M	synthèse de parois et de membranes		
VDIABv1					procédés cellulaires et signalisation
_270959	3,3	M	synthèse de parois et de membranes		
VDIABv1					Non caractérisé
_270095	3,3		Non caractérisé		
VDIABv1					procédés cellulaires et signalisation
_240075	3,3	N	mobilité cellulaire		
VDIABv1					peu caractérisé
_110286	3,3	S	fonctions inconnues		
VDIABv1					procédés cellulaires et signalisation
_270259	3,3	N	mobilité cellulaire		
VDIABv1					métabolisme
_110008	3,2	E	métabolisme et transport d'amino-acides		
VDIABv1					métabolisme
_270765	3,2	Q	Transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires		
VDIABv1					métabolisme
_270272	2,9	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone		
VDIABv1					procédés cellulaires et signalisation
_110554	2,8	N	mobilité cellulaire		
VDIABv1					peu caractérisé
_110499	2,8	R	fonctions générales		
VDIABv1					peu caractérisé
_100222	2,8	R	fonctions générales		
VDIABv1					stockage et traitement de données
_100559	2,8	K	Transcription		
VDIABv1					métabolisme
_270689	2,7	F	Métabolisme et transport de nucléotides		

Tableau VIII : Ensemble des gènes exprimés au moins 2 fois moins en présence de glucose chez *V. diabolicus*. La colonne COG comporte des lettres servant à classifier la fonction attribuée à chaque gène (procédé COG). C, E, G, H, I, P et Q correspondent au métabolisme, M, N, O, T, U et V correspondent aux procédés cellulaires et la signalisation, K et L aux stockage et traitement de données, R et S sont peu caractérisés. La colonne log₂fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

nom gène	log ₂ fdc	COG	description	procédé COG
VDIABv1				
_30354	-2,8	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1			modifications post-traductionnelles, renouvellement de protéines, synthèse de protéines chaperonnes	procédés cellulaires et signalisation
_110146	-2,8	O		
VDIABv1				
_30238	-2,8	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme

VDIABv1 _110562	-2,8	Q	transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _100264	-2,8	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110141	-2,8	O	modifications post-traductionnelles, renouvellement de protéines, synthèse de protéines chaperonnes	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _270398	-2,9	T	mécanismes de transduction du signal	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _110032	-2,9	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _220139	-2,9		Non caractérisé	
VDIABv1 _110142	-2,9		Non caractérisé	
VDIABv1 _110033	-2,9	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _220120	-3,0	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _100070	-3,0	K	transcription	stockage et traitement de données
VDIABv1 _10100	-3,0	S	fonctions inconnues	peu caractérisé
VDIABv1 _110253	-3,1	H	métabolisme et transport de coenzymes	métabolisme
VDIABv1 _230043	-3,2		Non caractérisé	
VDIABv1 _220047	-3,2	Q	transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _100590	-3,2	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _220167	-3,3	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _110252	-3,3	H	métabolisme et transport de coenzymes	métabolisme
VDIABv1 _110259	-3,3	P	métabolisme et transport d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _110723	-3,3	S	fonctions inconnues	peu caractérisé
VDIABv1 _270602	-3,3	H	métabolisme et transport de coenzymes	métabolisme
VDIABv1 _271122	-3,4	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _270603	-3,4	H	métabolisme et transport de coenzymes	métabolisme
VDIABv1 _30364	-3,5	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _220141	-3,6		Non caractérisé	
VDIABv1 _100553	-3,6	Q	transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _100578	-3,7		Non caractérisé	
VDIABv1 _110257	-3,7	U	Transport vésiculaire intracellulaire	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _100591	-3,7	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110242	-3,8	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _101012	-3,8	C	production et conversion d'énergie	métabolisme

VDIABv1 _110256	-3,8	U	Transport vésiculaire intracellulaire	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _270043	-3,8		Non caractérisé	
VDIABv1 _110548	-3,8	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _230065	-3,8	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _110258	-3,8	P	métabolisme et transport d'ions inorganiques	métabolisme
VDIABv1 _220048	-3,9	Q	transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _270670	-3,9	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _271117	-4,0	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _10075	-4,1	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _271119	-4,2	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _271118	-4,2	S	fonctions inconnues	peu caractérisé
VDIABv1 _90069	-4,3	F	métabolisme et transport de nucléotides	métabolisme
VDIABv1 _30239	-4,4	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _90070	-4,5	F	métabolisme et transport de nucléotides	métabolisme
VDIABv1 _100589	-4,6	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _30365	-4,6	S	fonctions inconnues	peu caractérisé
VDIABv1 _100540	-4,7	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _101013	-4,8	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100051	-4,8	R	fonctions générales	peu caractérisé
VDIABv1 _30147	-4,9	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _220140	-5,0	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _100352	-5,0	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _100544	-5,1		Non caractérisé	
VDIABv1 _270395	-5,3	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _270045	-5,4	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _271121	-5,4	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100572	-5,5	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _270396	-5,5	G	métabolisme et transport des hydrates de carbone	métabolisme
VDIABv1 _270804	-5,6	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110590	-5,9	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme

VDIABv1 _220049	-6,1	Q	transport, catabolisme et biosynthèse de métabolites secondaires	métabolisme
VDIABv1 _30318	-6,2	T	mécanismes de transduction du signal	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _100585	-6,6	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100574	-6,6	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100588	-7,0	K	transcription	stockage et traitement de données
VDIABv1 _100552	-7,0	H	métabolisme et transport de coenzymes	métabolisme
VDIABv1 _100541	-7,1	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _270044	-7,2	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100573	-7,3	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100576	-7,3	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100543	-7,4	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100577	-7,4	K	transcription	stockage et traitement de données
VDIABv1 _100584	-7,5	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100575	-7,5	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100551	-7,5	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _110101	-7,6	O	modifications post-traductionnelles, renouvellement de protéines, synthèse de protéines chaperonnes	procédés cellulaires et signalisation
VDIABv1 _100071	-7,6	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100542	-7,8	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100549	-8,0	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _100583	-8,0	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100546	-8,4	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100579	-8,4	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100582	-8,5	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100550	-8,6	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _100545	-8,6	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme
VDIABv1 _100547	-8,7	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100581	-8,8	I	métabolisme et transport de lipides	métabolisme
VDIABv1 _100580	-9,2	C	production et conversion d'énergie	métabolisme
VDIABv1 _100548	-9,5	E	métabolisme et transport d'amino-acides	métabolisme

IV. Profil transcriptomique de *V. diabolicus* en présence de glucose.

Les 194 gènes différentiellement exprimés ont été classés dans 18 catégories fonctionnelles avec l'outil « COG Automatic Classification », disponible sur le système MaGe. (Tableaux VI et VII)

La présence de glucose dans le milieu de culture a induit chez *V. diabolicus* un ensemble de gènes, majoritairement répartis dans trois groupes fonctionnels : métabolisme et transport d'ions inorganiques, production et conversion d'énergie, ainsi que métabolisme et transport d'acides aminés (Figure 22). D'autre part, les gènes réprimés en présence de glucose sont principalement répartis dans les trois groupes fonctionnels : métabolisme et transport de lipides, métabolisme et transport d'acides aminés et production et conversion d'énergie (Figure 22). Ceci indique que la bactérie change radicalement de comportement énergétique lorsque le glucose est ajouté au milieu.

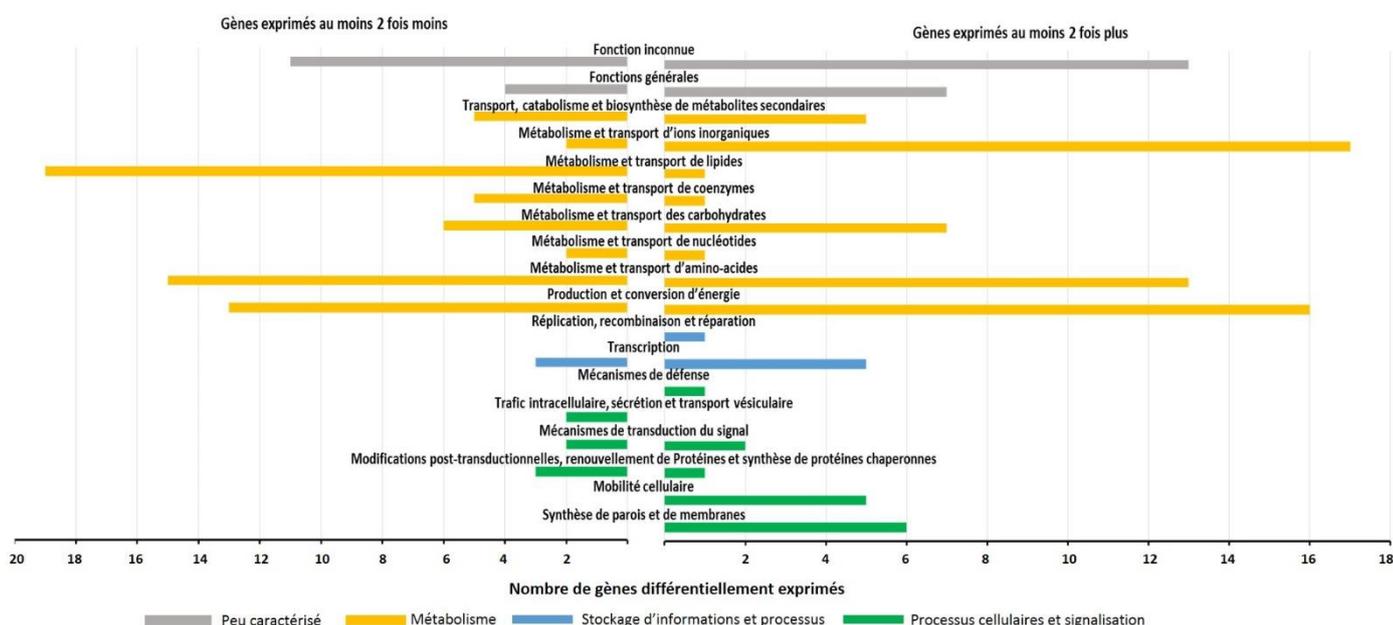


Figure 22 : Classement par grandes fonctions des gènes différentiellement transcrits chez *V. diabolicus* en présence de glucose.

Les produits des gènes transcrits au moins 7 fois plus (Tableau IX) et au moins 7 fois moins (Tableau X) en présence de glucose, ont été répertoriés, afin de préciser quelles fonctions étaient les plus affectées par la présence de ce substrat.

Tableau IX : Ensemble des gènes transcrits au moins 7 fois plus chez *V. diabolicus* en présence de glucose. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

gène	log2fdc	produit du gène
VDIABv1_100558	11,5	alpha-acétolactate décarboxylase (fragment)
VDIABv1_100557	11,1	alpha-acétolactate décarboxylase (fragment)
VDIABv1_100555	10,4	3-oxoacyl-ACP réductase (FabG)
VDIABv1_220223	10,3	protéine conservée de fonction inconnue
VDIABv1_100556	9,9	acétolactate synthase
VDIABv1_100984	9,1	préssumé composant périplasmique de type transporteur ABC pour le nitrate, le sulfonate et le bicarbonate
VDIABv1_110354	8,7	préssumé composant périplasmique de type transporteur ABC pour le phosphate
VDIABv1_100983	8,1	présumée perméase pour le transport du nitrate
VDIABv1_100224	8	présumée protéine périplasmique pour la fixation de solutés
VDIABv1_250258	7,7	protéine régulatoire de l'azote P-II 1
VDIABv1_100982	7,6	protéine NasD pour le transport du nitrate
VDIABv1_100108	7,6	protéine de type transporteur ABC
VDIABv1_110158	7,6	protéine de la membrane externe
VDIABv1_100989	7,5	nitrate réductase
VDIABv1_30276	7,4	protéine conservée de fonction inconnue
VDIABv1_110353	7,3	présumée perméase pour le transport du phosphate
VDIABv1_110424	7,3	présumée perméase de la superfamille des transporteurs de métabolites (DMT)
VDIABv1_100107	7,3	préssumé composant périplasmique de type transporteur ABC pour les ions Fe ³⁺
VDIABv1_100783	7,2	préssumé transporteur pour le formiate et le nitrite

Les deux gènes les plus transcrits en présence de glucose (environ 11 fois plus), VDIABv1_100558 et VDIABv1_100557, sont séparés par une vingtaine de paires de bases sur le génome (Tableau IX). Ils ont été annotés comme fragmentés, et codant une enzyme, l'acétate décarboxylase. Chez *B. subtilis* cultivé en présence de glucose, cette enzyme, ainsi que l'acétolactate synthase, sont nécessaires à la production d'acétoïne en présence de pyruvate. Le gène VDIABv1_100556, codant l'acétolactate synthase, est transcrit 9,9 fois plus.

L'acétoïne est utilisée en industrie comme arôme alimentaire, et précurseur en chimie de synthèse (Zhang et al., 2013). Chez les phytopathogènes du genre *Dickeya*, l'acétoïne est produite au cours de l'infection de la plante, à partir des sucres consommés. Composé neutre, l'acétoïne permet alors de limiter l'acidité du milieu, afin de faciliter l'activité des enzymes lytiques du pathogène (Reverchon & Nasser, 2013).

Le gène VDIABv1_100555, transcrit 10,4 fois plus, code la 3-oxoacyl-ACP réductase (FabG). Cette enzyme catalyse la plus importante réaction réductrice, au cours de l'élongation des acides gras, une voie métabolique vitale pour les bactéries (Hou et al., 2016).

Les gènes VDIABv1_100984, VDIABv1_100983 et VDIABv1_100982, ainsi que les gènes VDIABv1_110354, VDIABv1_110353 et VDIABv1_110352, codent respectivement un transporteur ABC dédié au transport du nitrate, et un autre au transport du phosphate. En présence de glucose, les besoins de *V. diabolicus* en nitrate et en phosphate pourraient donc être accrus.

Parmi les gènes les moins transcrits, le gène VDIABv1_100580, code la méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase (Tableau X). Chez *B. subtilis*, cette enzyme joue un rôle dans trois voies métaboliques ; le métabolisme de l'inositol, la dégradation de la valine, la leucine et l'isoleucine, ainsi que le métabolisme du propanoate (Stines-Chaumeil, Talfournier, & Branlant, 2006).

Tableau X : Ensemble des gènes transcrits au moins 7 fois moins chez *V. diabolicus* en présence de glucose. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

gène	log2fdc	Produit du gène
VDIABv1_100548	-9,5	présumée protéine transmembranaire de type transporteur ABC
VDIABv1_100580	-9,2	méthylmalonate semialdéhyde déshydrogénase
VDIABv1_100581	-8,8	Isobutyryl-CoA déshydrogénase
VDIABv1_100547	-8,7	acyl-CoA synthétase (fragment)
VDIABv1_100550	-8,6	protéine de type transporteur ABC
VDIABv1_100545	-8,6	présumée protéine de type transporteur ABC pour la leucine, l'isoleucine et la valine
VDIABv1_100582	-8,5	présumée énoyl-CoA hydratase
VDIABv1_100546	-8,4	acyl-CoA synthétase (fragment)
VDIABv1_100579	-8,4	acétyl-CoA C-acétyltransférase
VDIABv1_100549	-8	présumée perméase de type transporteur ABC pour la leucine, l'isoleucine et la valine
VDIABv1_100583	-8	énoyl-CoA hydratase
VDIABv1_100542	-7,8	sous-unité bêta de flavoprotéine de transfert d'électrons
VDIABv1_110101	-7,6	protéase à sérine
VDIABv1_100071	-7,6	Malate synthase
VDIABv1_100584	-7,5	3-hydroxyisobutyrate déshydrogénase
VDIABv1_100575	-7,5	sous-unité bêta de la Méthylcrotonoyl-CoA carboxylase
VDIABv1_100551	-7,5	protéine de type transporteur ABC pour la leucine, l'isoleucine et la valine
VDIABv1_100543	-7,4	oxidoréductase de transfert d'électrons de flavoprotéines
VDIABv1_100577	-7,4	régulateur de transcription de la famille MerR
VDIABv1_100573	-7,3	sous-unité alpha de la Méthylcrotonoyl-CoA carboxylase

VDIABv1_100576	-7,3	Isovaléryl-CoA déshydrogénase
VDIABv1_270044	-7,2	malate synthase A
VDIABv1_100541	-7,1	sous-unité alpha de flavoprotéine de transfert d'électrons
VDIABv1_100588	-7	préssumé régulateur de transcription
VDIABv1_100552	-7	synthase du coenzyme F390

Les gènes VDIABv1_100547 et VDIABv1_100546, ont été annotés comme fragmentés, et codent l'acyl-CoA synthétase. Cette enzyme, présente chez tous les organismes, est impliquée dans différents processus métaboliques : par exemple, elle active la synthèse de lipides, le renouvellement de membranes ainsi que la dégradation d'acides gras (Black & DiRusso, 2003).

Le gène VDIABv1_100582 code l'énoyl-CoA hydratase. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, cette enzyme est requise pour la synthèse d'un inducteur de dispersion du biofilm. En l'absence de production de cet inducteur, le biofilm devient plus épais et abrite plus de biomasse (Amari, Marques, & Davies, 2013).

Le gène VDIABv1_100579 code l'acétyl-CoA C-acétyltransférase, une enzyme impliquée dans différentes voies métaboliques, comme le métabolisme des acides gras, ou la dégradation d'acides aminés comme la leucine, l'isoleucine ou la valine (Lynen et Ochoa, 1953). Cette enzyme est notamment utilisée pour améliorer la production recombinante chez *Saccharomyces cerevisiae*, d'un précurseur de polyhydroxyalcanoates (PHAs) (Yun et al., 2015). Les PHAs sont des polyesters biodégradables produits à partir de sucres ou de lipides par fermentation bactérienne.

Parmi ces gènes les plus sous exprimés quand on ajoute du glucose (Tableau X), neuf gènes (VDIABv1_100580, VDIABv1_100581, VDIABv1_100545, VDIABv1_100579, VDIABv1_100575, VDIABv1_100573, VDIABv1_100549, VDIABv1_100584 et VDIABv1_100551) sont impliqués dans la dégradation de la valine, la leucine ou l'isoleucine, ou dans leur transport. Les bactéries sont capables d'utiliser des acides gras et des acides aminés ramifiés, comme la valine, la leucine et l'isoleucine comme seule source de carbone et d'énergie (Kazakov et al., 2009). En présence de glucose, les besoins de *V. diabolicus* en ces éléments sont réduits, certainement du fait de l'arrêt de leur utilisation comme substrats énergétiques.

Aucun gène directement associable à la biosynthèse des EPS n'apparaît parmi ceux dont l'expression est la plus affectée par l'ajout de glucose dans le milieu.

A. Effet du glucose sur la transcription des gènes responsables de la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus*.

Les gènes responsables de la production des nucléotides sucres, précurseurs de la synthèse de l'EPS HE800 chez *E. coli* ont été étudiés. Ces gènes ont également été recherchés chez *V. diabolicus* par homologie (conf. Chapitre 4, I). Les niveaux de transcription de ces gènes ont été examinés, afin de déterminer si la présence de glucose active la production de l'EPS HE800 via une action sur la synthèse de ses précurseurs (Tableau XI)

Tableau XI : Niveaux de transcription des gènes de chez *V. diabolicus* comme potentiellement associés à la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

Gène	log2fdc	produit du gène	précurseur obtenu
VDIABv1_30022	1,1	UDP-glucose -6-déshydrogénase	UDP-acide glucuronique
VDIABv1_120049	-0,4	enzyme bifonctionnelle <i>N</i> -Acétylglucosamine-1-phosphate uridyltransférase / glucosamine-1-phosphate <i>N</i> -Acétyltransférase	UDP- <i>N</i> -Acétylglucosamine
VDIABv1_250159	0,6	UDP- <i>N</i> -Acétylglucosamine 4-épimérase	UDP- <i>N</i> -Acétylgalactosamine

La présence de glucose n'a pas d'effet inducteur ou inhibiteur sur les niveaux de transcription de ces gènes, les valeurs de log2fdc obtenues pour ces gènes ne sont pas significatives.

B. Etude de l'expression des clusters génétiques liés à la biosynthèse de glyco-polymères

L'analyse comparative du génome de *V. diabolicus* réalisée lors de travaux précédents (Goudenege et al., 2014), a permis d'identifier quatre clusters de biosynthèse de glyco-polymères, dont le cluster de l'EPS HE800 (Goudenege et al., 2014). Le premier (VDIABv1_10183 à 10185, associé dans l'article à VDIABv1_30001 jusqu'à 30023) est lié à la biosynthèse d'un LPS, le second (VDIABv1_110285 à 110295) coderait pour la biosynthèse d'un K_{LPS} (CPS ou EPS lié à la membrane). Le troisième (VDIABv1_270002 à 270019) contient les gènes pour la biosynthèse du Lipide A cœur, et la fonction du dernier cluster de

gènes (VDIABv1_270959 à 270974) a été assignée à la biosynthèse de l'EPS HE800 (Goudenege et al., 2014).

Les niveaux de transcription correspondant à ces quatre clusters ont été examinés (Tableaux XII à XV). Aucune différence significative de niveau de transcription n'a été notée lorsque la culture était réalisée avec du glucose, en ce qui concerne les deux clusters de biosynthèse de LPS et Lipide A cœur (Tableaux XIV et XV).

Tableau XII : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster HE800 chez *V. diabolicus*, en présence de glucose. La colonne log₂fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

Gène	log ₂ fdc
VDIABv1_270959 (<i>sypR</i>)	3,3
VDIABv1_270960 (<i>sypQ</i>)	0,9
VDIABv1_270961 (<i>sypP</i>)	-0,3
VDIABv1_270962 (<i>sypO</i>)	0,1
VDIABv1_270963 (<i>sypN</i>)	0,4
VDIABv1_270964 (<i>sypL</i>)	1,1
VDIABv1_270965 (<i>sypK</i>)	0,2
VDIABv1_270966 (<i>sypJ</i>)	0,9
VDIABv1_270967 (<i>sypI</i>)	1,5
VDIABv1_270968 (<i>sypH</i>)	-0,4
VDIABv1_270969 (<i>sypG</i>)	0,4
VDIABv1_270970 (<i>sypF</i>)	-1,7
VDIABv1_270971 (<i>sypD</i>)	-1,6
VDIABv1_270972 (<i>sypC</i>)	-1,6
VDIABv1_270973 (<i>sypB</i>)	-1,3
VDIABv1_270974 (<i>sypA</i>)	-0,3

Tableau XIII : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster K_{LPS} chez *V. diabolicus*, en présence de glucose. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

Gène	log2fdc
VDIABv1_110283	4,1
VDIABv1_110284	0,0
VDIABv1_110285	3,9
VDIABv1_110286	3,3
VDIABv1_110287	3,6
VDIABv1_110288	2,4
VDIABv1_110289	3,4
VDIABv1_110290	2,7
VDIABv1_110291	3,7
VDIABv1_110292	1,9
VDIABv1_110293	3,0
VDIABv1_110294	2,7
VDIABv1_110295	2,5
VDIABv1_110296	1,4
VDIABv1_110297	
VDIABv1_110298	1,5

Tableau XIV : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster lipide A cœur chez *V. diabolicus*, en présence de glucose. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

Gène	log2fdc
VDIABv1_270001	-0,11
VDIABv1_270002	0,04
VDIABv1_270003	-0,07
VDIABv1_270004	-0,07
VDIABv1_270005	0,09
VDIABv1_270006	1,42
VDIABv1_270007	1,34
VDIABv1_270008	0,63
VDIABv1_270009	0,31
VDIABv1_270010	0,57
VDIABv1_270011	0,93
VDIABv1_270012	0,13
VDIABv1_270013	0,49
VDIABv1_270014	-0,32
VDIABv1_270015	0,21
VDIABv1_270016	0,27
VDIABv1_270017	0,23
VDIABv1_270018	-0,24
VDIABv1_270019	0,46

Tableau XV : Niveaux de transcription des gènes composant le cluster LPS chez *V. diabolicus*, en présence de glucose. La colonne log2fdc indique le facteur de multiplication du niveau de transcription du gène considéré, en condition présence de glucose, par rapport à la condition absence.

Gène	log2fdc
VDIABv1_30001	0,96
VDIABv1_30002	0,73
VDIABv1_30003	0,82
VDIABv1_30004	0,81
VDIABv1_30005	0,90
VDIABv1_30006	
VDIABv1_30007	0,48
VDIABv1_30008	0,37
VDIABv1_30009	0,04
VDIABv1_30010	0,48
VDIABv1_30011	0,26
VDIABv1_30012	0,21
VDIABv1_30013	0,33
VDIABv1_30014	1,05
VDIABv1_30015	0,88
VDIABv1_30016	0,98
VDIABv1_30017	1,30
VDIABv1_30018	1,49
VDIABv1_30019	1,36
VDIABv1_30020	1,09
VDIABv1_30021	0,92
VDIABv1_30022	1,07
VDIABv1_30023	1,82

C. Le cluster de biosynthèse du HE800

En ce qui concerne le cluster HE800, le niveau de transcription du premier gène, *sypR*, responsable de l'initiation de la polymérisation du HE800, est 3 fois plus important en présence de glucose (Figure 23). Aucune variation significative n'est observée chez les autres gènes. En revanche, parmi les 16 gènes qui composent le cluster de biosynthèse K_{LPS} , 7 gènes présentent un niveau de transcription 3 à 4 fois plus important en présence de glucose.

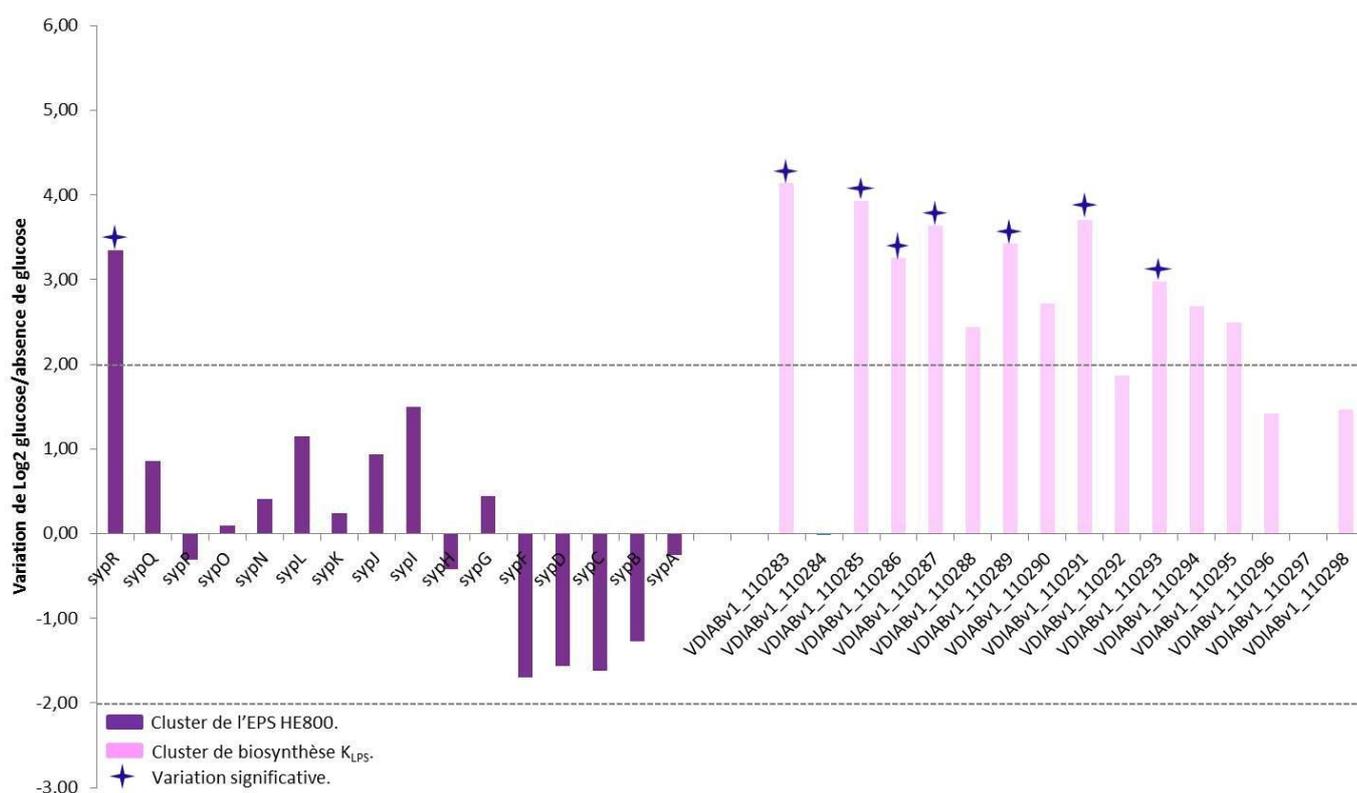


Figure 23 : Niveaux d'expression des gènes composant les clusters HE800 et K_{LPS} en condition « apport en glucose » par rapport à la condition « absence de glucose ».

Ces résultats sont quelque peu surprenants. Pour rappel, le cluster génétique de synthèse de l'EPS HE800 a été identifié par inactivation de son système de translocation des unités répétitives à travers la membrane (*sypK*) (Goudenege et al., 2014). En parallèle, il a été démontré que l'inactivation de *sypR* n'empêchait pas la production d'HE800 par *V. diabolicus*. Le transcriptome montre que seule la transcription de *sypR*, responsable de la glycosyltransférase d'initiation, est induite par la présence de glucose.

Il est possible que l'expression du cluster HE800 soit constitutive, et ne soit pas ou peu induite par l'ajout de substrat. En effet, lors de la cinétique préliminaire, en absence de glucose, une légère production d'EPS a été observée au bout de 26 heures de culture.

Le cluster de l'EPS HE800 de *V. diabolicus* présente une forte homologie avec le locus *syp* de *V. fischeri* (Fong, Syed, Klose, & Yildiz, 2010; Yildiz & Visick, 2009). Le cluster de *V. fischeri* comporte 18 gènes. Sur ce cluster, 4 promoteurs ont été identifiés en amont des gènes *sypA*, *sypI*, *sypM* et *sypP* (Yip et al., 2005).

Le profil transcriptionnel du cluster HE800 en présence de glucose, a été étudié en fonction de la présence potentielle de ces promoteurs (Figure 24).

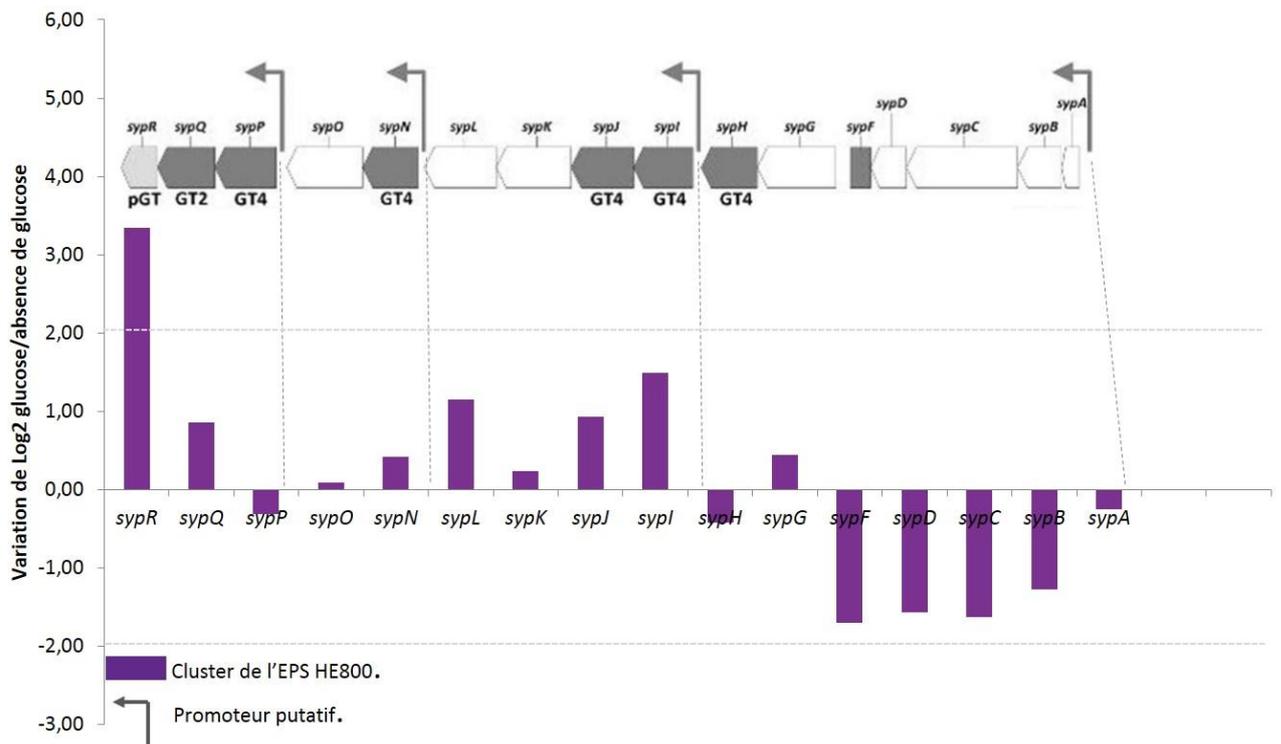


Figure 24 : Niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 en présence de glucose, corrélés aux promoteurs potentiellement présents sur le cluster HE800, placés par homologie avec le cluster *syp* de *V. fischeri*.

Aucun lien n'a été mis en évidence entre le profil de transcription du cluster en présence de glucose, et la présence de ses promoteurs potentiels. En effet, à l'exception de *sypR*, les niveaux de transcription des gènes du cluster ne varient pas de manière significative. De plus, en considérant la position de ces promoteurs, le segment composé des gènes *sypR*, *sypQ* et *sypP* est sensé constituer un opéron. Or, *sypR*, le gène le plus éloigné du promoteur putatif, est transcrit au moins trois fois plus, alors que les niveaux de transcriptions de *sypQ* et *sypP* ne varient pas de manière significative.

V. Discussion

Les transcriptomes de *V. diabolicus* en conditions induisant ou non la production de l'EPS HE800, ont été comparés. La présence de glucose dans le milieu de culture induit chez *V. diabolicus* un ensemble de 102 gènes, majoritairement répartis dans trois groupes fonctionnels : métabolisme et transport d'ions inorganiques, production et conversion d'énergie, ainsi que métabolisme et transport d'acides-amino. D'autre part, les 92 gènes réprimés sont principalement répartis dans les trois groupes fonctionnels : métabolisme et transport de lipides, métabolisme et transport d'acides-amino et production et conversion d'énergie.

Le glucose ne semble pas induire l'expression des gènes responsables de la synthèse d'UDP-acide glucuronique, d'UDP-*N*-Acétylglucosamine et d'UDP-*N*-Acétylgalactosamine, les précurseurs de l'EPS HE800, pas plus que les gènes composant le cluster, à l'exception de *sypR*, qui code pour l'enzyme initiateur. Il est donc possible que l'expression du cluster et des voies de synthèse des précurseurs soit constitutive. Ce serait donc la régulation des autres voies de consommation des précurseurs qui régulerait leur disponibilité et l'affinité des enzymes utilisatrices de précurseurs qui générerait les priorités de la cellule : en l'absence de glucose, il y aurait peu d'EPS synthétisé et les précurseurs seraient utilisés pour la construction cellulaire, alors qu'en présence de glucose les précurseurs excédentaires seraient polymérisés en HE800. Ceci est cohérent avec le fait que tous les *Vibrio* ne possèdent pas forcément de cluster EPS et ne synthétisent pas forcément de polysaccharide (Chapitre 1) ; cette activité n'est pas indispensable à la survie de ce genre de bactérie.

Les gènes les plus induits en présence de glucose, codent des enzymes homologues à des protéines impliquées dans la synthèse d'acétoïne chez *B. subtilis*, et des transporteurs de nitrate et de phosphate. Le besoin de ces nutriments semble accru dans cette condition. Il est possible que la synthèse d'acétoïne, un composé neutre, soit un moyen de limiter l'acidification du milieu au cours de la fermentation.

Chez la plupart des microorganismes, le glucose est le substrat le plus utilisé comme source d'énergie et souvent le substrat préférentiel, via des mécanismes complexes de répression catabolique. Néanmoins, les fortes concentrations de glucose induisent aussi des inhibitions de croissance, les doses inhibitrices étant spécifiques de chaque espèce. La plupart des bactéries du genre *Vibrio* sont sensibles au glucose, leur croissance est arrêtée en présence de 1 % de glucose (10 g/L) (Yoon & Mekalanos, 2006). Les souches de type *Vibrio cholerae* El Tor croissent sans difficulté en présence de jusqu'à 3 % de glucose (30 g/L) (Yoon & Mekalanos, 2006). Les métabolismes carbonés du pathogène classique *Vibrio cholerae* séro-groupe O1, et les variétés El Tor, ont été comparées (Yoon & Mekalanos, 2006). *V. cholerae* El Tor produit du 2,3-butanediol, le précurseur de l'acétoïne, alors que chez *V. cholerae* séro-groupe O1, cette voie de fermentation n'est pas fonctionnelle. La capacité à produire le 2,3-butanediol, confère un avantage aux variétés El Tor, en accroissant leur viabilité par une limitation de l'acidification du pH, lors de la fermentation de substrats carbonés (Yoon & Mekalanos, 2006). Les gènes responsables de la synthèse de 2,3-butanediol sont présents chez les deux organismes, mais leurs niveaux de transcriptions sont très faibles chez *V. cholerae* séro-groupe O1, comparé à *V. cholerae* El Tor (Yoon & Mekalanos, 2006).

Afin de tester la synthèse potentielle de 2,3- butanediol ou d'acétoïne par *V. diabolicus*, il serait nécessaire de le soumettre à un test de Voges–Proskauer, lors de la fermentation de substrats carbonés (Romick & Fleming, 1998).

Les gènes les plus réprimés en présence de glucose sont principalement impliqués dans la dégradation de la valine, la leucine, l'isoleucine, ou dans leur transport. Les bactéries sont capables d'utiliser des acides gras et des acides aminés ramifiés comme seule source de carbone et d'énergie. Le glucose apportant suffisamment d'énergie, les besoins de *V. diabolicus* en ces éléments sont réduits.

Chapitre 3 : Etude de la production recombinante de l'exopolysaccharide

HE800

Les propriétés biologiques de l'EPS HE800 reposent sur ses caractéristiques structurales : ainsi, les dérivés dépolymérisés et sulfatés ont montré des activités biologiques GAG-mimétiques. Afin de mieux contrôler les caractéristiques structurales de l'EPS produit, il est nécessaire de connaître et maîtriser ses modalités de biosynthèse pour pouvoir envisager ensuite sa valorisation biotechnologique. La physiologie de la biosynthèse a été étudiée lors d'un travail de thèse précédent (Boursicot, 2012). Cette étude avait notamment montré que la variation des quantités des sources de carbone et d'azote, glucose et acétate d'ammonium, respectivement, permettait de moduler la masse moléculaire de la molécule produite mais sa composition chimique restait identique. Par ailleurs, en 2014, le cluster génétique codant pour la biosynthèse de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus* a été identifié (Goudenege et al., 2014).

Les bactéries du genre *Vibrio* ne représentent pas un outil idéal pour l'ingénierie génétique ; de plus, leur métabolisme est encore peu étudié. L'expression hétérologue du cluster de gènes responsable de la synthèse de l'EPS HE800 chez un hôte connu, aisément modifiable génétiquement, faciliterait la compréhension de la biosynthèse de l'EPS HE800, ainsi que l'aménagement de voies métaboliques destinées à optimiser sa production. Cette étude ouvre la voie vers la biologie synthétique et la production de molécules EPS aux caractéristiques structurales ciblées.

Le cluster de gènes associé à la biosynthèse de l'EPS HE800 a donc été cloné chez *Escherichia coli*.

I. Création et criblage de la banque fosmidique d'ADN génomique

Le clonage du cluster de l'EPS HE800 a été réalisé avec le kit EpiFOS™ Fosmid Library Production, un kit destiné à la réalisation d'une banque d'ADN génomique. Le fosmide pCC1FOS inclus dans le kit est caractérisé par son importante capacité d'insertion (jusqu'à 40

Kb), et permet l'expression des promoteurs compris dans les fragments clonés (Tableau III). Ce kit a précédemment été utilisé avec succès pour l'expression recombinante d'un cluster de taille similaire (Amiri-Jami & Griffiths, 2010). La souche hôte fournie avec le kit est une souche de *E. coli* DH10B (lignée K12), dénommée *E. coli* Epi 100 (Tableau II).

La banque a été réalisée selon les directives indiquées dans le protocole du kit EpiFOS™. En considérant la taille du génome de *V. diabolicus* (5,13 Mégabases) et celle du cluster HE800 (20 kilobases), la réalisation d'au moins 461 clones était nécessaire pour en obtenir un contenant l'insert souhaité.

Afin de déterminer le taux d'insertion, une extraction du fosmide a été réalisée sur une vingtaine de clones. Chaque produit a été soumis à une digestion par l'enzyme de restriction EcoRI (site unique de coupure sur le fosmide pCC1FOS), avant d'être analysé par électrophorèse en gel d'agarose. Sur 20 clones analysés, 15 présentaient un insert de la taille souhaitée. Ces inserts étaient coupés, car la séquence du cluster HE800 comporte 2 sites de coupure EcoRI. La taille de chaque fragment correspond à la somme des tailles des différents fragments obtenus. La banque génomique préparée présentait donc un taux d'insertion de 75 %. Environ 1000 clones issus de la banque ont été isolés puis criblés, par trois méthodes différentes successives.

A. Criblage sur gélose enrichie en glucose

V. diabolicus présente un phénotype mucoïde lorsqu'il est cultivé sur gélose enrichie en glucose, un premier criblage des clones recombinants a donc été réalisé en s'appuyant sur cette propriété. La banque obtenue a été étalée sur gélose LB Cm enrichie en glucose à la teneur de 30 g/L, afin de mettre en évidence un phénotype plus mucoïde et brillant, d'un ou plusieurs clones recombinants. Malheureusement, aucun clone ne se distinguait des autres (Figure 25). Le cluster de biosynthèse de l'EPS HE800 était peut-être trop faiblement exprimé pour entraîner l'apparition d'un phénotype marqué. De la même façon, les ressources en précurseurs du HE800 pourraient être insuffisantes chez la souche hôte, pour assurer à la fois la synthèse de ses parois et la production du polymère HE800 de manière détectable. D'autres stratégies de criblage ont donc été envisagées.



Figure 25 : Clones recombinants repiqués sur gélose LB Cm enrichie en glucose à la teneur de 30 g/L.

B. Criblage par hybridation sur colonie

Cette technique a déjà utilisée avec succès pour cribler une banque similaire afin de produire de l'acide hyaluronique avec des microorganismes recombinants (Amiri-Jami & Griffiths, 2010).

1. Choix des sondes

Le dessin des sondes a été effectué à partir des séquences des gènes *sypR* (pGT1) et *sypC* (Wza), car ils se situent aux deux extrémités du cluster. Des amorces destinées à amplifier un fragment avoisinant les 500 pb ont été dessinées pour chacun de ces gènes (Tableau IV). Les sondes ont alors été synthétisées par amplification PCR, et leur taille a été vérifiée sur gel d'agarose. Elles ont ensuite été marquées. Un premier criblage a été envisagé avec la sonde dessinée pour *sypC*, suivi d'un second avec celle correspondant à *sypR* pour les clones identifiés comme porteurs de *sypC*.

2. Préparation des membranes

Quatre-cent quatre-vingt-dix-neuf clones ont été repiqués sur milieu solide LB Cm glucose 30g/L en double exemplaire (une boîte pour la membrane et une boîte témoin pour la sauvegarde). Lorsque les colonies ont été visibles, une membrane en nitrocellulose a été déposée sur la boîte appropriée et l'incubation a été poursuivie quelques heures. Une colonie de *V. diabolicus* a été rajoutée en tant que témoin positif sur chaque membrane, avant traitement.

3. Hybridation et révélation

L'hybridation de la sonde sur les membranes a été réalisée à 40,4°C et les lavages à température ambiante. Lors de la révélation, sur les cinq témoins positifs, un seul était légèrement visible (Figure 26). Cette technique ne semblait donc pas adaptée pour cribler rapidement et efficacement la banque.

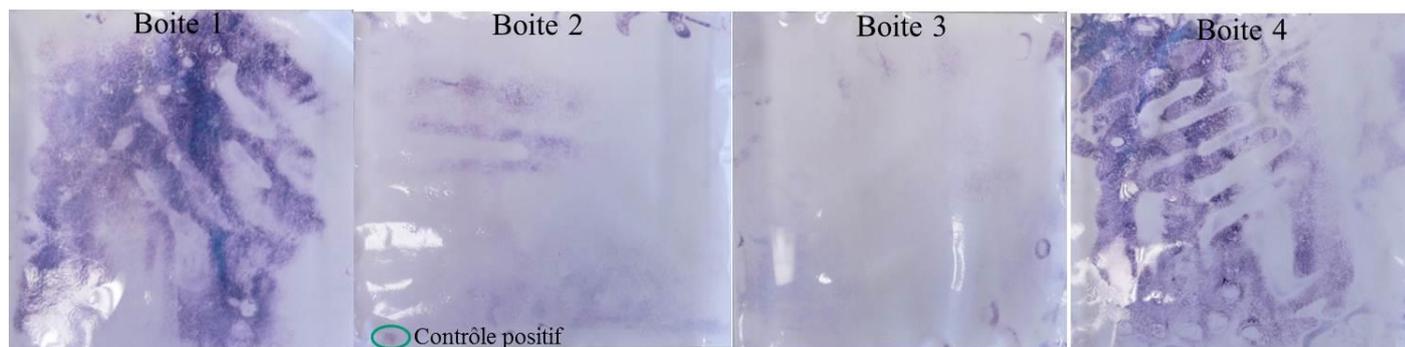


Figure 26 : Résultat du criblage par hybridation sur colonie avec la sonde dessinée pour *sypC*. Le contrôle positif est l'ADN génomique de *V. diabolicus*.

4. Criblage par PCR

Les matrices ADN ont été préparées directement à partir des boîtes témoins réalisées pour l'hybridation. Une amplification a été réalisée sur ces matrices avec les amorces dessinées pour la sonde correspondant à *sypC*. L'analyse des amplicons obtenus a permis de retenir cinq candidats : les clones 49, 78, 2, 59 et 92. Ces clones ont ensuite été soumis à un second criblage avec les amorces dessinées pour la sonde correspondant à *sypR*, qui se fixent à l'autre extrémité du cluster. Un amplicon de la taille attendue a été obtenu pour chacun des cinq clones (Figure 27). Le cluster de biosynthèse de l'EPS HE800 semblait donc avoir été cloné en entier chez ces 5 clones.

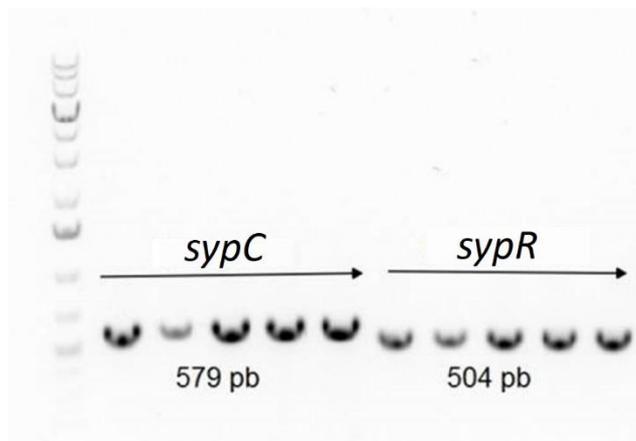


Figure 27 : Vérification de la présence des gènes *sypC* et *sypR* chez les clones 2, 49, 59, 78 et 92.

II. Etude de la production d'EPS par les clones recombinants

Les différents clones recombinants obtenus au cours de cette étude ont été soumis à des tests de production de polysaccharide, afin d'évaluer leur capacité de biosynthèse du HE800.

Chez *V. diabolicus*, la production de l'EPS HE800 est obtenue en supplémentant du milieu Zobell en glucose à la teneur de 30 g/L. Chez *E. coli* K4, une supplémentation en fructose, *N*-acétylglucosamine ou acide glucuronique permet d'améliorer la production d'un EPS de composition proche de celle de l'HE800 (Restaino et al., 2013). Des tests basés sur ces informations ont été effectués sur les souches recombinantes obtenues en milieu LB ou R (milieu décrit pour les études chez *E. coli* K4), supplémenté en glucose, fructose ou sucres composant l'EPS HE800 (acide glucuronique, *N*-Acétylglucosamine et *N*-Acétylgalactosamine).

A. Analyse du milieu extracellulaire de la culture des premiers clones recombinants

Les clones 2, 49, 59, 78 et 92 ont été cultivés en Erlenmeyers de 5 L (2,5 L de milieu), en milieu LB Cm supplémenté en glucose ou fructose à la teneur de 30 g/L, à 37°C, sous agitation, pendant 48 heures.

Un suivi de croissance pour toutes les souches a été effectué en milieu supplémenté en glucose afin, de comparer les capacités de développement des souches recombinantes. Au bout de 48 heures de culture l'absorbance finale varie entre 1,7 et 2 selon les clones, et leur profil de croissance est similaire à celui observé avec la souche *E. coli* Epi 100 sans insert (Figure 28).

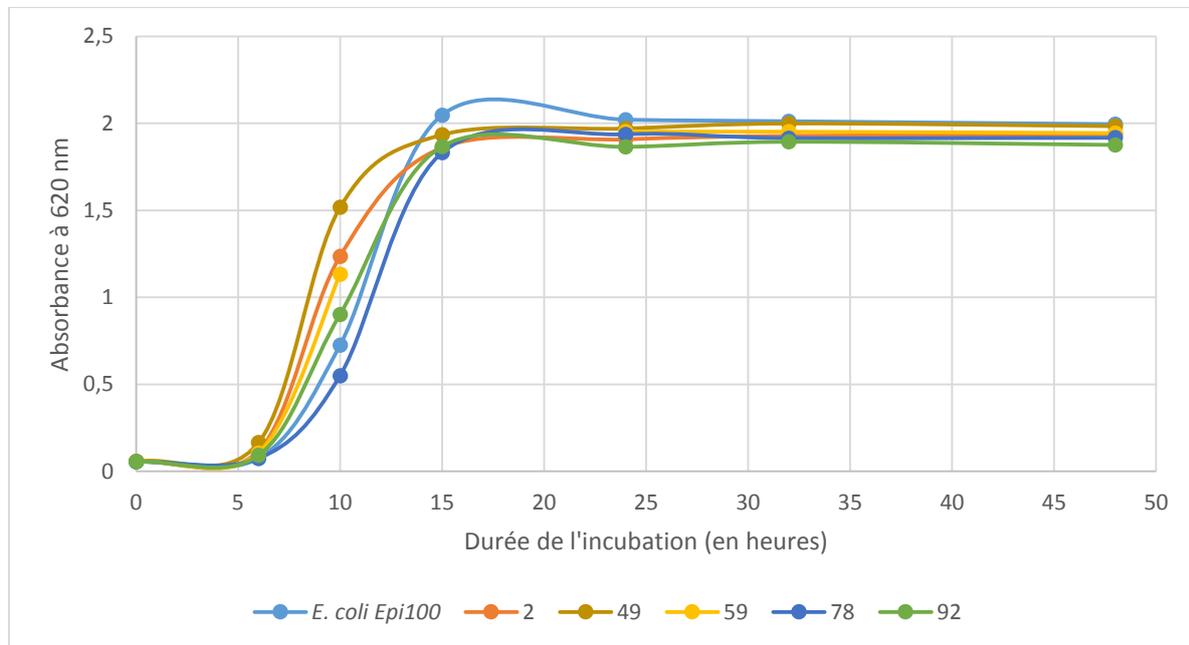


Figure 28 : Suivi de croissance de la souche *E. coli* Epi100 et des clones 2, 49, 59, 78 et 92 en milieu LB supplémenté en glucose à la teneur de 30 g/L.

Un suivi de croissance a également été réalisé pour le clone 49 en milieu supplémenté en glucose et en fructose (Figure 29). Le clone 49 a été retenu pour cette expérience car le lyophilisat total du surnageant de culture était plus important en régime glucose. Au bout de 48 heures, l'absorbance de la culture supplémentée en glucose est de 1,6, alors que celle enrichie en fructose est de 2,8.

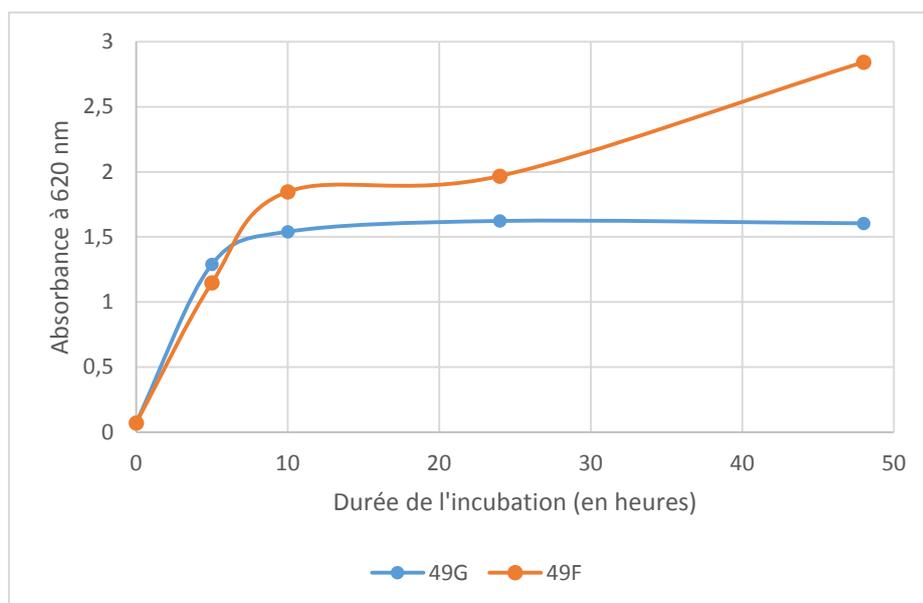


Figure 29 : Suivi de croissance du clone 49 en milieu LB supplémenté en glucose (49G) et en fructose (49F) à la teneur de 30 g/L.

Les lyophilisats obtenus à partir des surnageants de culture ultrafiltrés (2,5 L) ont été pesés, avant d'être soumis à différents tests : dosage des protéines, des acides uroniques, composition osidique par chromatographie en phase gazeuse. Entre 140 mg et 1,6 g de lyophilisat ont été obtenus pour chaque échantillon (Tableau XVI).

Les lyophilisats sont caractérisés par la présence de 1 à 9 % d'acides uroniques, et 22 à 33 % de protéines. La masse moléculaire des polymères produits varie de 10^4 à 10^6 g/mol.

Tableau XVI : Caractérisation des lyophilisats des clones recombinants par dosage colorimétrique. Les % massiques caractérisent la masse de lyophilisat, la colonne sucre indique quel substrat a été utilisé pour la culture, l'absorbance indiquée est celle relevée en fin de culture (48 heures).

clone	sucre	Masse lyophilisat (g)	protéines (% massique)	acides uroniques (% massique)	absorbance (600 nm)
2	glucose	0,62	29	1	1,6
2	fructose	0,4	26	1	2,3
49	glucose	1,5	22	6	1,5
49	fructose	1,63	33	5	2,4
59	glucose	0,35	28	1	1,6
59	fructose	0,65	30	6	2,4
78	glucose	0,58	24	5	1,5
78	fructose	0,63	31	9	2,3
92	glucose	0,14	26	7	1,5
92	fructose	0,3	30	3	2,2

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a montré que les polymères produits présentent une composition en sucres différente selon le clone testé et le sucre ajouté au milieu de croissance (glucose ou fructose) (Figure 30). Le mannose est présent majoritairement dans presque tous les échantillons. Aucun des clones ne produit un polymère semblable au HE800. Des traces de *N*-Acétylglucosamine sont retrouvées dans les produits synthétisés par les clones 2 et 92 ayant consommé du glucose et du fructose, et dans le lyophilisat du clone 78 ayant poussé sur glucose uniquement (Figure 30). Des traces de *N*-Acétylglucosamine et de *N*-Acétylgalactosamine sont présentes dans le lyophilisat du clone 59 (régime fructose). Le polymère synthétisé par le clone 49 présente des traces d'acide glucuronique et de *N*-Acétylglucosamine ; c'est aussi le clone pour lequel le rendement est le plus important (1,6 g).

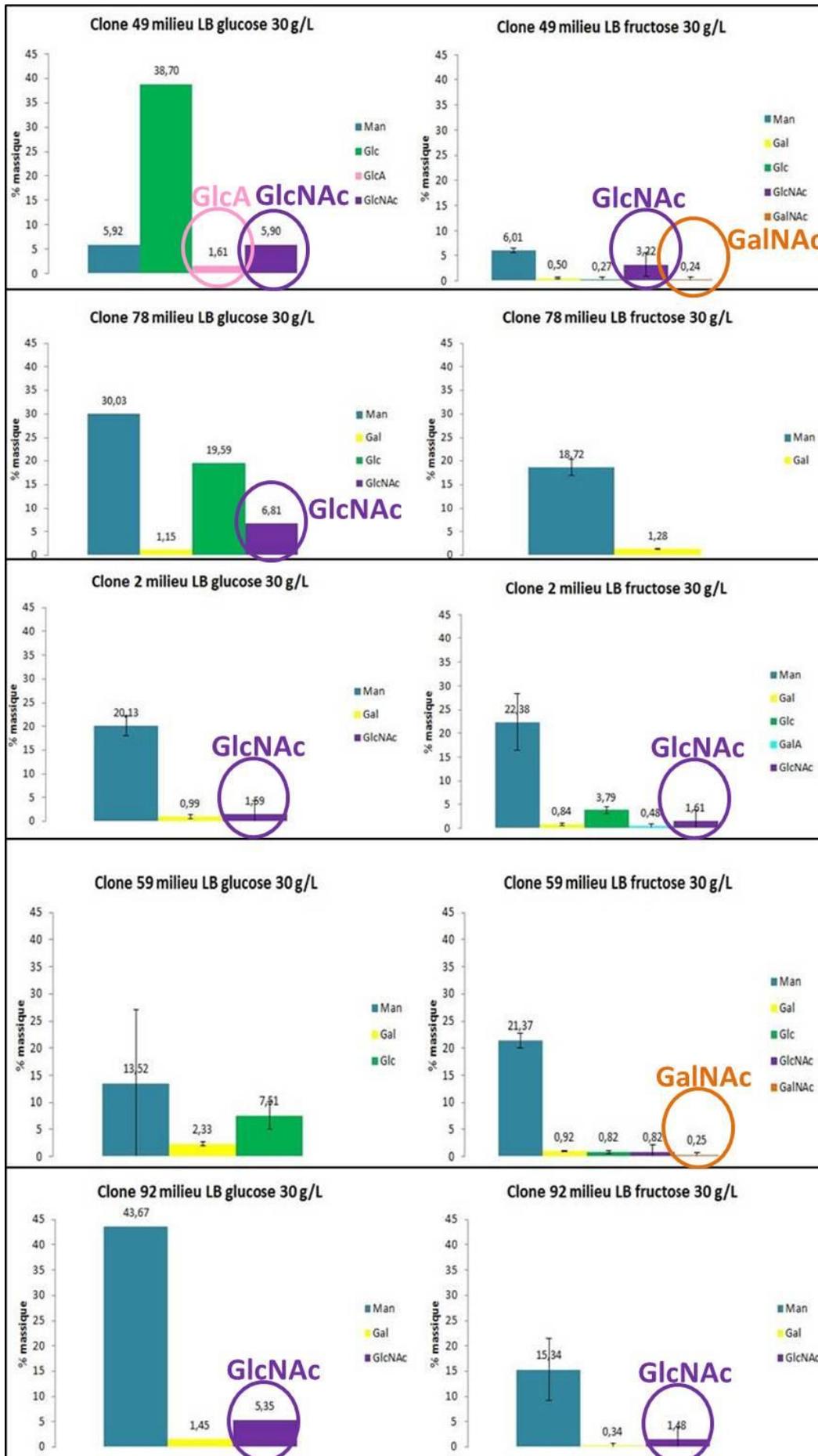


Figure 30 : Composition (pourcentage massique) des lyophilisats des clones 49, 78, 2, 59 et 92 en régime glucose et fructose (Man = mannose, Gal = galactose, Glc = glucose, GlcNAc = *N*-Acétylglucosamine, GalNAc = *N*-Acétylgalactosamine, GlcA = acide glucuronique, GalA = acide galacturonique).

La souche hôte *E.coli* Epi100, dépourvue du vecteur fosmidique, produit également un polymère en régime fructose, dénué d'acides uroniques, d'après l'analyse colorimétrique. En revanche, aucun polymère n'est produit en régime glucose (Figure 31).



Figure 31 : Lyophilisat obtenu par croissance de la souche *E. coli* Epi100 (à partir de 2,5 L de surnageant), en milieu LB fructose à gauche et LB glucose à droite.

Ainsi, aucune des souches recombinantes obtenues n'a produit l'EPS HE800 à partir de glucose ou de fructose. Il est possible que la synthèse des précurseurs osidiques de l'acide glucuronique, de la *N*-Acétylglucosamine et du *N*-Acétylgalactosamine nécessaires à l'assemblage de l'EPS HE800, soit insuffisante chez la souche hôte. En effet, l'UDP-*N*-Acétylglucosamine, qui est aussi le précurseur de l'UDP-*N*-Acétylgalactosamine chez *E. coli*, est également utilisé pour la synthèse des parois cellulaires (Yu & Stephanopoulos, 2008) ; il existe donc potentiellement une compétition entre les fonctions de croissance cellulaire et de production de polysaccharide. De plus, l'UDP-glucose déshydrogénase catalysant la formation de l'UDP-acide glucuronique, le composant majoritaire de l'EPS HE800, est décrite comme faiblement active chez les souches d'*E. coli* non pathogènes (Mao et al., 2009). Afin de répondre à cette problématique, des croissances en milieu complémenté en acide glucuronique, *N*-Acétyl glucosamine et *N*-Acétylgalactosamine ont été étudiées.

Il est également possible que l'expression du cluster HE800 dépende de facteurs de transcription présents chez *V. diabolicus* et absents chez *E. coli*. Enfin, le système d'export du polymère est peut-être non-fonctionnel chez les souches recombinantes, entraînant une accumulation intracellulaire ou périplasmique d'oligosaccharides composés de l'unité répétitive du polymère. Néanmoins, cela semble peu probable car la croissance des clones

recombinant n'est pas affectée. Il a toutefois semblé intéressant d'examiner le contenu intracellulaire des clones recombinants.

B. Analyse du contenu extracellulaire et intracellulaire du clone 49

Pour cette partie, seul le clone 49 a été considéré. Ce choix a été dicté par le meilleur rendement global obtenu pour ce clone lors des précédents tests de production.

Le milieu R contient du glycérol comme source de carbone. Ce milieu, supplémenté en acide glucuronique et en *N*-Acétylgalactosamine (sucres composant le polysaccharide capsulaire K4), ou en fructose, a permis d'augmenter la production de polysaccharide capsulaire K4 (CPS K4) de 60 % chez *E. coli* K4 (Restaino et al., 2013). Le milieu décrit dans cette publication a été utilisé ici et supplémenté avec les sucres composant l'EPS HE800 (acide glucuronique, *N*-Acétylglucosamine et *N*-Acétylgalactosamine) pour tenter d'obtenir une production par les clones recombinants.

Les conditions de culture optimisées pour la production du CPS K4 (utilisation du milieu R, concentration du substrat d'au moins 0,385 mM) ont été appliquées au clone 49, comparées à des cultures sur LB avec glucose ou fructose, afin de vérifier si un apport en sucres précurseurs de l'EPS HE800 permet d'établir sa synthèse chez le clone recombinant 49 (Tableau XVI). Au cours de cette expérience, les culots ont également été récupérés pour analyse du contenu « intracellulaire ».

Tableau XVII : Cultures effectuées avec le clone 49.

culture	milieu	supplémentation
A	LB	fructose 30 g/L
B	LB	glucose 30 g/L
C	LB	acide glucuronique 0,77 mM + (N-Acétylglucosamine + N-Acétylgalactosamine) 0,77 mM
D	R	acide glucuronique 0,77 mM + (N-Acétylglucosamine + N-Acétylgalactosamine) 0,77 mM

Dans cette étude, les polymères produits, « intracellulaires » et excrétés, ont été extraits puis analysés par électrophorèse.

Les gels d'électrophorèse ont été colorés au réactif de Schiff après oxydation à l'acide périodique. Quinze microlitres d'acide hyaluronique à 2 mg/mL ont également été utilisés comme témoin positif (Figure 32).

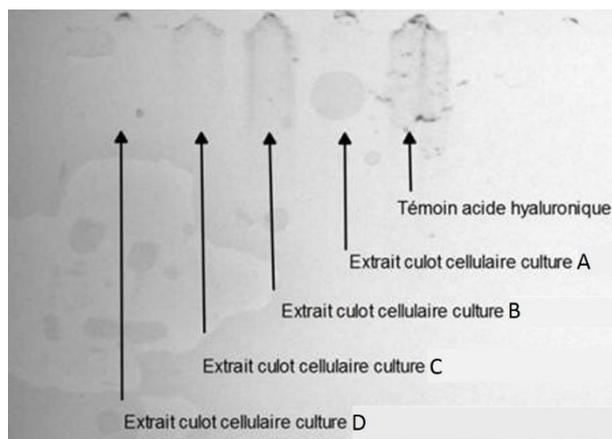


Figure 32 : Coloration au réactif de Schiff après séparation par électrophorèse des extraits intracellulaires du clone 49 (cultures, A, B, C et D, Tableau XVII).

Une faible coloration rose est observée pour les échantillons B et C. Cependant, ce résultat est difficilement interprétable car la coloration du témoin positif est elle-même faible (Figure 32).

La coloration au réactif de Schiff est utilisée pour la mise en évidence de sucres neutres (Serfozo & Elekes, 2010), alors que l'acide hyaluronique est chargé négativement (Sze et al., 2016), ceci pourrait expliquer sa faible coloration.

Un second gel a donc été réalisé avec les mêmes échantillons (extraits intracellulaires des cultures A, B, C et D) concentrés 6 fois au speed vac, ainsi que les surnageants obtenus pour les cultures A et B, également concentrés (Figure 33).

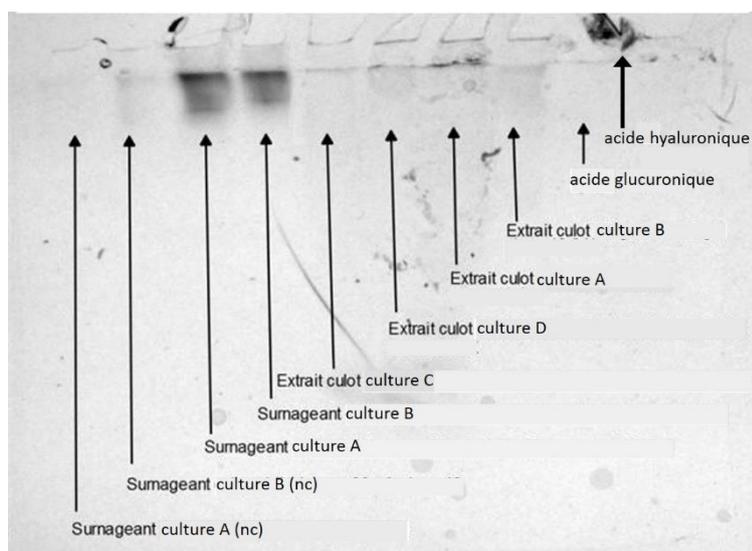


Figure 33 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide, suivie d'une coloration au réactif de Schiff des extraits intracellulaires et des surnageants des cultures A, B, C et D du clone 49. Les échantillons qui n'ont pas été concentrés avant dépôt sont indiqués par (nc).

Le témoin acide hyaluronique est cette fois bien visible (en haut à droite) ; le polymère est resté dans le puits et n'a pas pénétré dans le gel (Figure 33). Aucune coloration marquée n'est observée pour les extraits intracellulaires concentrés obtenus à partir des cultures A, B, C et D. Les surnageants concentrés des cultures A et B sont colorés, contrairement aux mêmes surnageants non concentrés. Néanmoins, le polymère coloré a pénétré dans le gel, contrairement au témoin (Figure 33).

Le dernier gel présenté sur la Figure 33 a été recoloré au Stains-All (Figure 34). Le témoin acide hyaluronique est coloré en bleu, alors que les extraits intracellulaires concentrés obtenus à partir des cultures A, B, C et D, ainsi que les surnageants concentrés des cultures A et B sont colorés en rouge-violet.

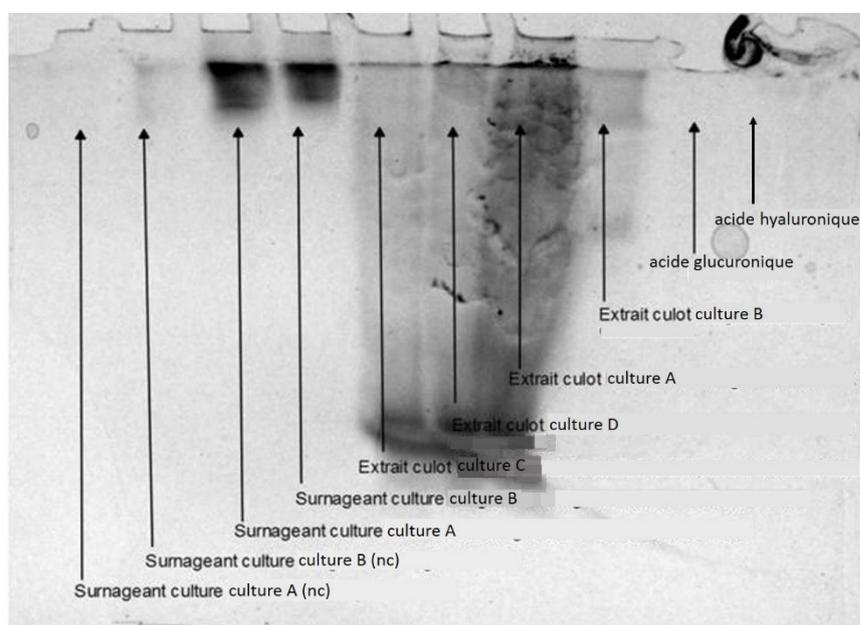


Figure 34 : Recoloration au Stains-All du gel précédent (Figure 33).

Le Stains-All permet de colorer les protéines acides comme les phosphoprotéines, ainsi que les exopolysaccharides acides comme le HE800 et l'acide hyaluronique en bleu. Les autres protéines ou polysaccharides sont colorés en rouge-violet ou rose. La coloration au Stains-All des extraits intracellulaires concentrés, obtenus à partir des cultures A, B, C et D, ainsi que celle des surnageants concentrés des cultures A et B, n'a mis en évidence que la présence de protéines non acides (rouge-violet). Si l'EPS recherché est présent dans ces échantillons, il l'est en bien trop faible quantité, par rapport aux protéines, pour être détecté par cette coloration (une faible coloration bleue pourrait être masquée par la forte coloration rouge-violet observée).

Les surnageants des cultures C et D ont été filtrés, ultrafiltrés, lyophilisés et dialysés, avant d'être déposés sur gel et colorés au Stains-All (Figure 35).

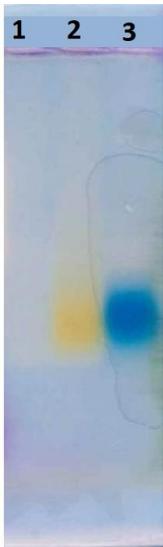


Figure 35 : Coloration au Stains-All des lyophilisats dialysés obtenus à partir des surnageants des cultures C et D. Lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture C (1), lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture D (2), témoin positif HE800 (3).

Aucune coloration n'est observée pour le lyophilisat obtenu à partir du surnageant de la culture C (Figure 35). Une coloration jaune est visible pour le D, à la même hauteur que le témoin positif. Aucune signification n'a été trouvée pour une coloration jaune au Stains-All. Les échantillons ont également été soumis au dosage des acides uroniques, les résultats se sont avérés négatifs. A ce stade, aucune production d'EPS HE800 n'a été détectée pour le clone recombinant 49 en supplémentant le milieu de culture avec ses sucres précurseurs.

C. Vérification des séquences des clusters portés par les clones recombinants

Puisque les différentes conditions de culture testées n'ont pas abouti à l'obtention de l'EPS HE800, l'éventuelle présence de mutations sur les clusters clonés, pouvant expliquer cette absence de production d'EPS, a été vérifiée. Leur séquençage a été réalisé.

Une série d'amplifications PCR a été réalisée sur chaque clone de façon à couvrir la totalité de l'insert (Tableau IV). L'analyse des séquences a été effectuée à l'aide du logiciel DNA Dragon

(Sequentix). D'après les résultats, les clones 92 et 59 sont exempts de mutation (Tableau XVII). Les clones 2, 49 et 92 portent quant à eux des mutations ponctuelles dans les gènes *sypD*, *K*, *N* et *O* ou dans une zone intergénique. L'influence des mutations sur la séquence en acides aminés n'a pas été vérifiée.

Tableau XVIII : Mutations observées sur les clusters des clones recombinants.

Clone	Nature de la mutation	Position sur le génome	Correspondance sur le génome
Clone 2	2 T attendus, 1 seul T compté mais pic large.	4829297	<i>sypN</i> (4828686-4829810)
Clone 2	2 A attendus, 1 seul A compté mais pic large.	4838720	<i>sypD</i> (4838471-4839157)
Clone 78	G attendu, non présent sur séquence Forward, présent sur séquence Reverse.	4828303	<i>sypO</i> (4827256-4828689)
Clone 78	A en plus	4832559	<i>sypK</i> (4831287-4832717)
Clone 49	2 T attendus, 1 seul T compté mais pic large.	4829305	<i>sypN</i> (4828686-4829810)
Clone 49	T en plus	4837894	Région intergénique (<i>sypG/sypF</i>).

L'étude a été poursuivie avec les clones 59 et 92, exempts de mutation.

D. Analyse des contenus intra et extracellulaires des clones 92 et 59 après croissance à différentes températures.

La température de culture est un facteur déterminant pour l'expression de protéines recombinantes chez *E. coli*. Une production élevée de protéines recombinantes peut entraîner leur aggrégation à l'intérieur de la bactérie (corps d'inclusion). Ce phénomène peut être limité en diminuant la température de culture, et donc le niveau de production de la protéine (Vasina & Baneyx, 1997).

Afin de tester si des températures de culture plus basses, ne permettraient pas de débloquent l'expression du polysaccharide chez les souches recombinantes, de nouveaux tests de production ont été lancés pour les clones 59 et 92.

1. Viabilité

L'hypothèse selon laquelle le système d'export du polymère pourrait être non-fonctionnel chez les souches recombinantes, entraînant une accumulation intracellulaire de l'unité répétée, ou

périplasmique du polymère, n'a pas été écartée. Une telle accumulation entraînerait probablement un retard de croissance et/ou une lyse cellulaire. La viabilité du clone 92 a donc été testée. Il a été soumis à 72 heures de culture en milieu LB supplémenté en glucose à la teneur de 30 g/L. Une goutte de cette culture a permis d'ensemencer une gélose LB Cm, et a donné naissance à de multiples colonies 24 heures plus tard. La viabilité du clone 92 ne semble pas affectée.

2. Influence de la température sur la production

Les clones 92 et 59 ont été cultivés en milieu LB Cm (200 mL) supplémenté en fructose à la teneur de 30 g/L, à 20°C et 30°C. Le fructose a été préféré au glucose pour ces tests, en raison des bons résultats obtenus avec ce substrat pour l'amélioration de la production du CPS K4 (Restaino et al., 2013). Au bout de 48 heures de culture, la turbidité des cultures a été évaluée puis le milieu a été centrifugé, le culot récupéré et un aliquot de surnageant collecté ; le reste de surnageant a été filtré, ultrafiltré et lyophilisé. Au bout de 48 heures de culture, la croissance du clone 92 est meilleure à 30°C qu'à 20°C, cette tendance semble légèrement inversée pour le clone 59 (Tableau XIX).

Tableau XIX : Absorbance des cultures des clones 92 et 59 à 20°C et 30°C au bout de 48 heures de culture.

Culture	Absorbance (600 nm)
Clone 92, 20°C	1,1
Clone 92, 30°C	2,1
Clone 59, 20°C	1,7
Clone 59, 30°C	1,3

Environ 0,14 g de chaque culot a été repris dans 700 µL de TAE, et soniqué dans la glace, avant centrifugation (12 000 g). Les extraits intracellulaires ainsi que les surnageants de culture ont été déposés sur gel d'agarose, avant coloration au Stains-All (Figure 36).

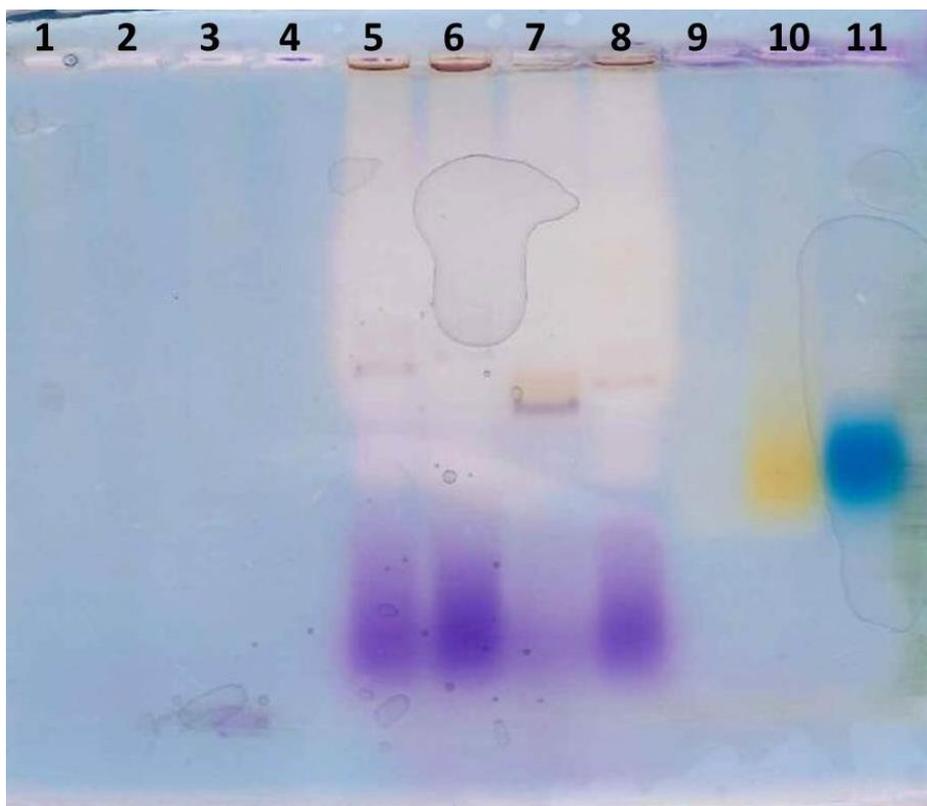


Figure 36 : Coloration au Stains-All des extraits intracellulaires et surnageants des clones 59 et 92 cultivés à 20°C et 30°C en milieu LB supplémenté en fructose à la teneur de 30 g/L. Surnageant de culture du clone 92 cultivé à 30°C (1), surnageant de culture du clone 92 cultivé à 20°C (2), surnageant de culture du clone 59 cultivé à 30°C (3), surnageant de culture du clone 59 cultivé à 20°C (4), extrait intracellulaire du clone 92 cultivé à 20°C (5), extrait intracellulaire du clone 59 cultivé à 20°C (6), extrait intracellulaire du clone 92 cultivé à 30°C (7), extrait intracellulaire du clone 59 cultivé à 30°C (8), lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture C (9) (Figure 35), lyophilisat dialysé obtenu à partir du surnageant de la culture D (10) (Figure 25), témoin positif HE800 (11).

La coloration au Stains-All n'a pas mis en évidence la présence d'EPS HE800 dans les surnageants de culture des clones 92 et 59 cultivés à 20 et 30 °C (Figure 36, puits 1, 2, 3 et 4), pour lesquels aucune coloration n'est observée. En revanche, des dépôts colorés sont visibles pour les extraits intracellulaires correspondants (puits 5, 6,7 et 8). Mais ce n'est vraisemblablement pas un polysaccharide car la masse moléculaire est faible. De plus, la coloration, plus violette que bleue, pourrait indiquer la présence d'acides nucléiques.

Une analyse par chromatographie en phase gazeuse a été réalisée, afin de caractériser plus précisément le contenu intracellulaire des clones 59 et 92.

3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits

De nouveaux extraits intracellulaires, obtenus à partir du reste des culots congelés des clones 59 et 92 cultivés à 20 et 30°C avec du fructose, ont été préparés et analysés en chromatographie en phase gazeuse (solution obtenue à partir de 200 mg de culot humide repris dans 1 mL d'eau ultrapure). Pour chaque échantillon, 200 µL d'extraits intracellulaires ont été utilisés, après une filtration préalable (0,45 µm). Les surnageants de ces cultures, lyophilisés après avoir été ultrafiltrés, ont également été analysés.

Des profils de pic pouvant correspondre aux sucres attendus (acide glucuronique notamment) ont été observés sur les chromatogrammes correspondant aux extraits intracellulaires des clones 59 et 92 (Figure 37, A à D). Cependant, les temps de rétention ne correspondaient pas exactement à ceux attendus, par rapport aux standards. De plus, tous les pics caractéristiques des sucres de l'EPS HE800 n'étaient pas présents, par comparaison avec le profil de l'EPS HE800 de *V. diabolicus*, donné en Figure 37 I. Aucun pic correspondant aux sucres attendus n'a été détecté sur les chromatogrammes correspondant aux surnageants lyophilisés des cultures (Figure 37, E à H). Le dosage colorimétrique des acides uroniques effectué sur les échantillons n'a pas non plus révélé la présence des sucres recherchés.

Figure 37 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des cultures des clones 92 et 59. **A :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 59 cultivé à 20°C, **B :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 59 cultivé à 30°C, **C :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 92 cultivé à 20°C, **D :** analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires du clone 92 cultivé à 30°C, **E :** analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 92 cultivé à 20°C, **F :** analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 92 cultivé à 30°C, **G :** analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 59 cultivé à 20°C, **H :** analyse par chromatographie en phase gazeuse du surnageant de culture lyophilisé du clone 59 cultivé à 30°C, **I :** analyse par chromatographie en phase gazeuse de l'EPS HE800 produit par *V. diabolicus*.

a) Analyses par chromatographie en phase gazeuse complémentaires

Afin de vérifier si les pics observés dans les chromatogrammes des extraits intracellulaires des clones 59 et 92 correspondent bien à l'acide glucuronique et à la *N*-Acetylgalactosamine (Figure 37, A à D), une nouvelle expérience a été réalisée. Cette fois certains échantillons analysés ont été mélangés avec les sucres recherchés, afin de vérifier si leurs pics se superposent. Seul le clone 92 a été cultivé à nouveau à 30°C, avec comme témoin, la souche *E.coli* Epi100 cultivée à 20°C et 30°C, avec toujours du fructose comme substrat, à la teneur de 30 g/L.

Des aliquots de surnageants de culture ont été prélevés. Les extraits intracellulaires, issus de chacun des trois culots repris dans 5 mL d'eau ultrapure, ont été soumis à 3 jours de dialyse (seuil de coupure 500 Da), afin d'éliminer les sucres libres présents. Ils ont ensuite été lyophilisés. Les surnageants de culture ont également été filtrés, ultrafiltrés puis lyophilisés.

Au bout de 48 heures de culture, la croissance d'*E.coli* Epi100 est plus élevée à 30°C qu'à 20°C, la croissance à 30°C du clone 92 reste sensiblement la même que pour l'expérience précédente (D. 2, Tableau XIX), elle est similaire à celle de la souche non recombinante *E. coli* Epi100 (Tableau XX).

Tableau XX : Absorbance des cultures de la souche *E. coli* Epi100 à 20°C et 30°C, et du clone 92 à 30°C, au bout de 48 heures de culture.

Culture	Absorbance (600 nm)
<i>E. coli</i> Epi100, 20°C	1,4
<i>E. coli</i> Epi100, 30°C	2,5
Clone 92, 30°C	2,3

Après lyophilisation, le contenu intracellulaire (186 mg) du clone 92 cultivé à 30°C présentait un aspect duveteux (Figure 38), au contraire de celui de la souche *E. coli* Epi100 (83 mg), cultivée à la même température. Les absorbances des deux cultures étaient proches (Tableau XX).



Figure 38 : contenus intracellulaires lyophilisés d'*E. coli* Epi100 à gauche, et du clone 92 à droite, cultivés à 30°C.

En parallèle de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, les extraits intracellulaires dialysés, ainsi que les surnageants de culture d'*E. coli* Epi100 cultivé à 30°C et 20°C, et du clone 92 cultivé à 30°C (Tableau XX), ont été déposés sur gel d'agarose avant coloration au Stains-All (Figure 39). Cette coloration n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un EPS dans les surnageants de culture (puits 3,4 et 7), ni dans les extraits intracellulaires dialysés (puits 2, 5 et 6) du clone 92 et de la souche *E. coli* Epi100. Il est difficile de conclure ici, car la coloration du témoin HE800 est très diffuse (puits 1) (Figure 39).

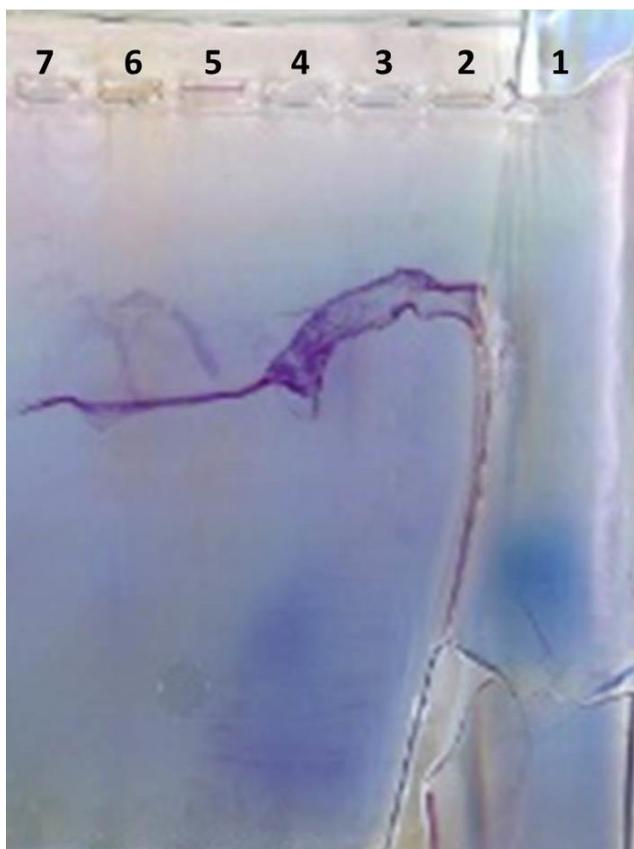


Figure 39 : Coloration au Stains-All des surnageants de cultures et contenus intracellulaires dialysés du clone 92 et de la souche *E. coli* Epi100 cultivés à 30 et 20°C. Témoin positif HE800 (1), extrait intracellulaire dialysé de la souche Epi100 cultivée à 20°C (2), surnageant de culture lyophilisé de la souche Epi100 cultivée à 20°C (3), surnageant de culture lyophilisé de la souche Epi100 cultivée à 30°C (4), extrait intracellulaire dialysé de la souche Epi100 cultivée à 30°C (5), extrait intracellulaire dialysé du clone 92 cultivé à 30°C (6), surnageant de culture lyophilisé du clone 92 cultivé à 30°C (7).

Ces échantillons ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse (Tableau XXI).

Tableau XXI : Echantillons analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Culture	échantillons
<i>E. coli</i> Epi100, 20°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé
<i>E. coli</i> Epi100, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé
Clone 92, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé
<i>E. coli</i> Epi100, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé + GlcA + GlcNAc+ GalNAc
Clone 92, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé + GlcA + GlcNAc+ GalNAc

Lors de la première expérience (Figure 37), des pics pouvant correspondre à l'acide glucuronique et à la *N*-Acétylgalactosamine avaient été identifiés dans les spectres des extraits intracellulaires purs des clones 59 et 92 cultivés à 20°C et 30°C (Figure 37, A à D). Dans la seconde expérience (Figure 40), les extraits intracellulaires ont été préalablement dialysés et lyophilisés, ce qui a permis de les traiter en chromatographie en phase gazeuse à la concentration de 2 mg/mL précisément, selon le protocole habituel.

En ce qui concerne les chromatogrammes correspondant aux extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E.coli* Epi100 (témoin) cultivée à 30 et 20°C, peu de pics sont présents, aucun ne correspond aux sucres recherchés (Figure 40, A et B). Les échantillons des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 et du clone 92 cultivés à 30°C, dans lesquels ont été ajoutés les sucres recherchés présentent bien les pics caractéristiques (Figure 40, E et D). Pour les extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, les pics observés lors de la première expérience (Figure 37 D) ne sont pas retrouvés, et peu de pics sont présents (Figure 40 C).

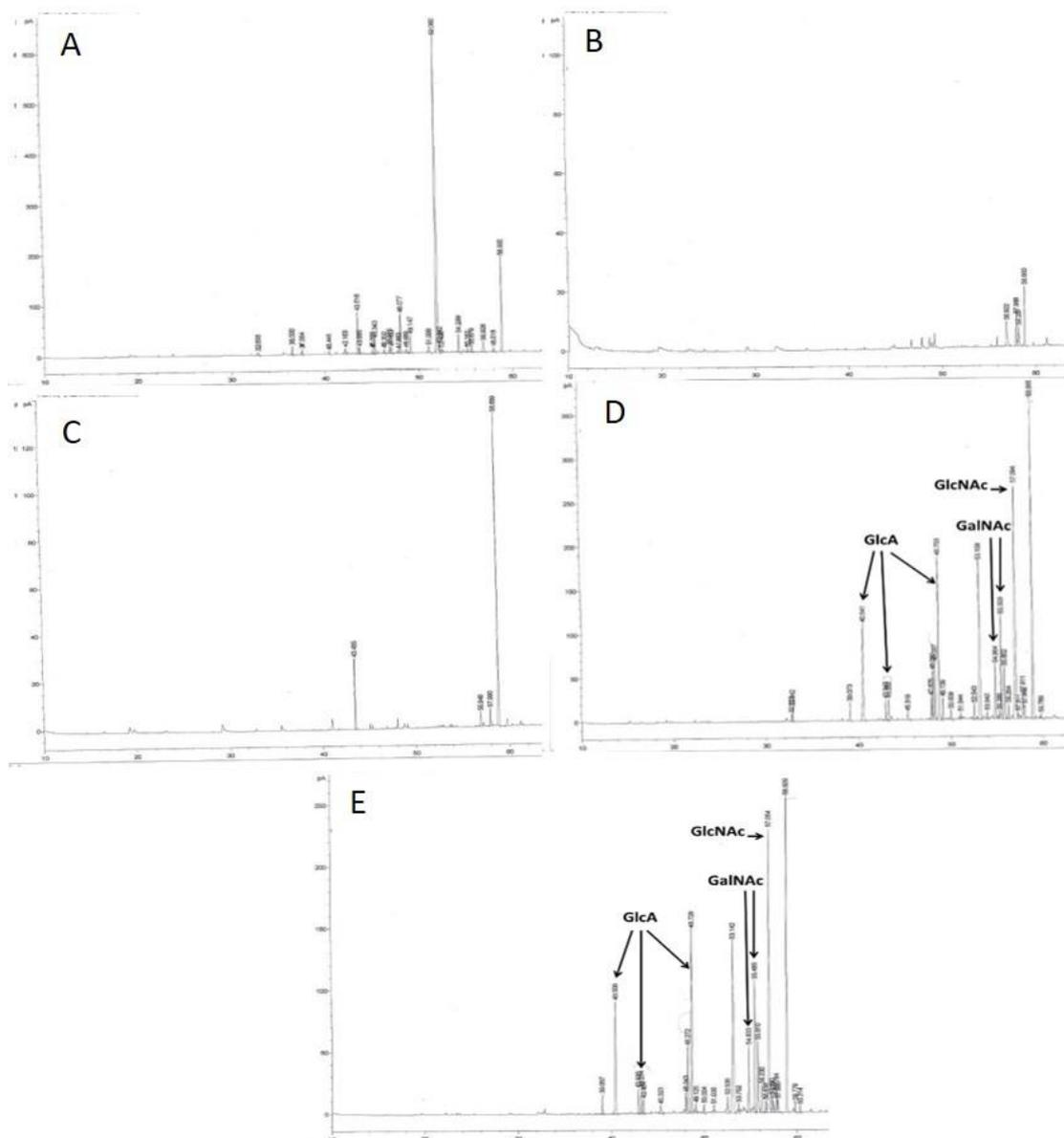


Figure 40 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse des produits des cultures du clone 92 et de la souche *E. coli* Epi100. **A** :analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 20°C, **B** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E. coli* Epi100 cultivée à 30°C, **C** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, **D** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C (ajout GlcA, GalNAc et GlcNAc dans l'échantillon), **E** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés de la souche *E.coli* Epi100 cultivée à 30°C (ajout GlcA, GalNAc et GlcNAc dans l'échantillon).

Lors de la première expérience (Figure 37), pour chaque échantillon, 200 μ L d'extraits intracellulaires filtrés (solution obtenue à partir de 200 mg de culot humide repris dans 1 mL d'eau ultrapure) ont été utilisés. Pour la seconde expérience (Figure 40), pour chaque

échantillon, 200 µL à 2 mg/mL (soit 400 µg) d'extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés ont été utilisés. Du fait de la lyophilisation, une plus faible quantité de produit a probablement été analysée, les sucres recherchés ne sont donc peut-être pas présents en quantité suffisante dans l'échantillon (Figure 40 C) pour être détectables. Il est également possible que les sucres aient été dégradés lors de l'étape préalable de dialyse effectuée à température ambiante (présence d'une enzyme par exemple). Afin de vérifier cette dernière hypothèse, une nouvelle expérience a été préparée.

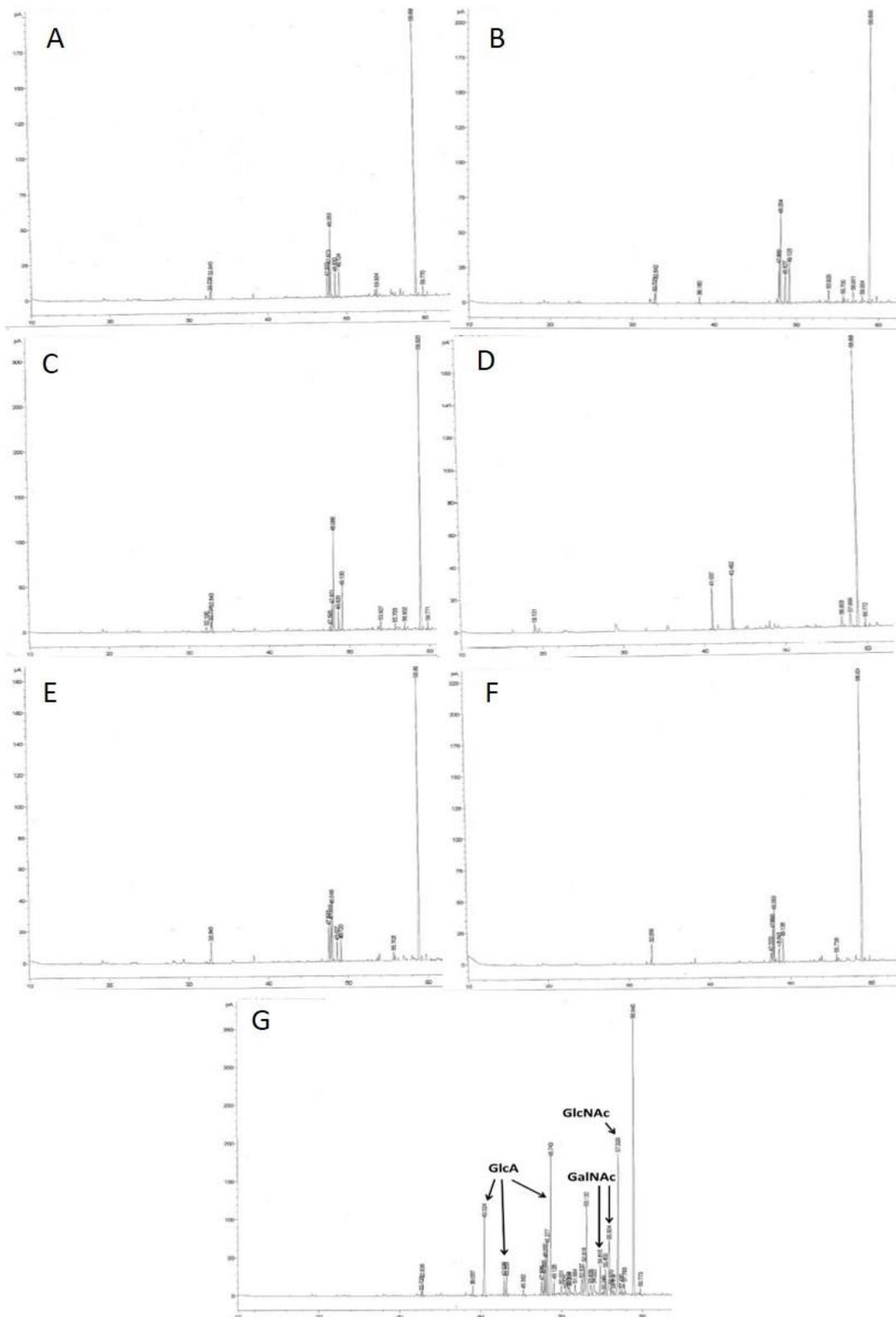
b) Evaluation de l'impact de la dialyse sur l'analyse GC des extraits intracellulaires des clones recombinants 59 et 92.

L'expérience a été réalisée avec la souche *E. coli* Epi100, et les clones 92 et 59, cultivés à 30°C, avec du fructose à la teneur de 30 g/L. Les culots ont été lavés pour éliminer les résidus, puis, après la seconde centrifugation, repris dans 5 mL d'eau ultrapure. La moitié des extraits intracellulaires obtenus a été directement placée à -20°C avant lyophilisation, l'autre moitié a d'abord été dialysée (500 Da pendant 3 jours). L'ensemble des échantillons a ensuite été analysé par chromatographie en phase gazeuse (Tableau XXII). Les sucres recherchés (GlcA, GlcNAc et GalNAc) ont été ajoutés aux extraits intracellulaires lyophilisés du clone 92, afin de vérifier si leurs pics se superposent aux pics de l'échantillon sur le chromatogramme obtenu.

Tableau XXII : Echantillons analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Culture	échantillon
<i>E. coli</i> Epi100, 30°C	extrait intracellulaire lyophilisé
<i>E. coli</i> Epi100, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé
Clone 59, 30°C	extrait intracellulaire lyophilisé
Clone 59, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé
Clone 92, 30°C	extrait intracellulaire lyophilisé
Clone 92, 30°C	extrait intracellulaire dialysé et lyophilisé
Clone 92, 30°C	extrait intracellulaire lyophilisé + GlcA+ GlcNAc + GalNAc

Aucune différence n'a été observée entre les extraits intracellulaires directement lyophilisés (Figure 41, A, C et E), et ceux préalablement dialysés (Figure 41, B, D et F). Aucun pic correspondant aux sucres recherchés n'a été détecté dans les chromatogrammes correspondant à la souche *E. coli* Epi100, et aux clones 59 et 92 cultivés à 30°C (Figure 41, A à F). En revanche, les extraits intracellulaires lyophilisés du clone 92 cultivés à 30°C, dans lesquels ont été ajoutés les sucres recherchés, présentent bien les pics caractéristiques (Figure 41 G). L'hypothèse selon laquelle les sucres auraient été dégradés pendant la dialyse réalisée lors de la seconde expérience (Figure 40), et donc entraîné la disparition des pics observés sur les chromatogrammes de la première expérience (Figure 37), a été écartée.



en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 59 cultivé à 30°C, **E** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, **F** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires dialysés et lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C, **G** : analyse par chromatographie en phase gazeuse des extraits intracellulaires lyophilisés du clone 92 cultivé à 30°C (ajout GlcA, GalNAc et GlcNAc à l'échantillon).

Ces expériences n'ont donc pas permis de mettre en évidence la production intracellulaire ou extracellulaires d'EPS HE800 chez les clones recombinants 92 et 59 cultivés à 20 et 30°C avec du fructose à la teneur de 30 g/L.

A ce stade, différentes hypothèses ont été envisagées pour expliquer la non-production de l'EPS HE800 par les clones recombinants. Il est possible que le cluster cloné ne soit pas exprimé chez *E.coli*, ou que les protéines traduites du cluster ne soient pas fonctionnelles. Il est également possible que la synthèse de précurseurs sucres UDP-GlcA, UDP-GlcNAc et UDP-GalNAc soit insuffisante chez la souche d'*E.coli* utilisée, pour supporter la synthèse de l'EPS HE800.

Pour la suite de l'étude, seul le clone 92 a été utilisé. Une étude transcriptionnelle comparative de chacun des gènes du cluster HE800, chez *V. diabolicus* et le clone 92, en condition productrice, a été envisagée, afin de vérifier si ce cluster semble exprimé chez le clone 92. Des modifications génétiques chez le clone 92 ont été envisagées également, afin d'augmenter la disponibilité de ses sucres précurseurs de l'EPS HE800.

E. Modification du clone 92 : Transformation du clone 92 avec *kfid* et *wbpP*

En plus de l'optimisation des milieux de culture, un autre moyen d'améliorer la production d'un EPS, ou d'établir sa production recombinante, est l'ingénierie métabolique au niveau des voies de biosynthèse des précurseurs d'intérêt. Les voies de biosynthèse permettant la production des précurseurs de l'EPS HE800 sont connues chez la souche hôte (Figures 42 et 43).

L'ajout d'un exemplaire du gène responsable de la synthèse de l'UDP-*N*-Acétylglucosamine-4-épimérase, pourrait permettre que davantage d'UDP-GlcNAc soit transformé en UDP-GalNAc disponible pour la synthèse de l'EPS HE800. Lors de l'étude de la production en milieu LB supplémenté en fructose ou glucose (Figure 30), 7 échantillons sur 10 comportaient de la *N*-Acétylglucosamine et seulement 2 de la *N*-Acétylgalactosamine. L'ajout de copies de gènes impliqués dans la synthèse de précurseurs a déjà été utilisé avec succès pour accroître la production de polymères. Ainsi, chez une souche d'*E.coli* BL21 modifiée pour la synthèse de l'héparosane, un précurseur de l'héparine composé d'acide glucuronique et d'*N*-

Acétylglucosamine, l'ajout d'un exemplaire du gène de la déshydrogénase a permis de doubler la production d'héparosane (Zhang et al., 2012). En ce qui concerne la production recombinante d'acide hyaluronique chez *E.coli*, un polysaccharide composé d'acide glucuronique et de *N*-acétylglucosamine, l'ajout d'un exemplaire de la déshydrogénase est nécessaire à sa synthèse (Mao et al., 2009).

A partir de ces données, une modification du clone 92 avec les plasmides pWKS-*wbpP* contenant le gène codant l'épimérase de *Pseudomonas aeruginosa* et pBBR-*KfiD* contenant le gène codant la déshydrogénase d'*E.coli* K5 (don de monsieur Bernard Priem, a) été envisagée.

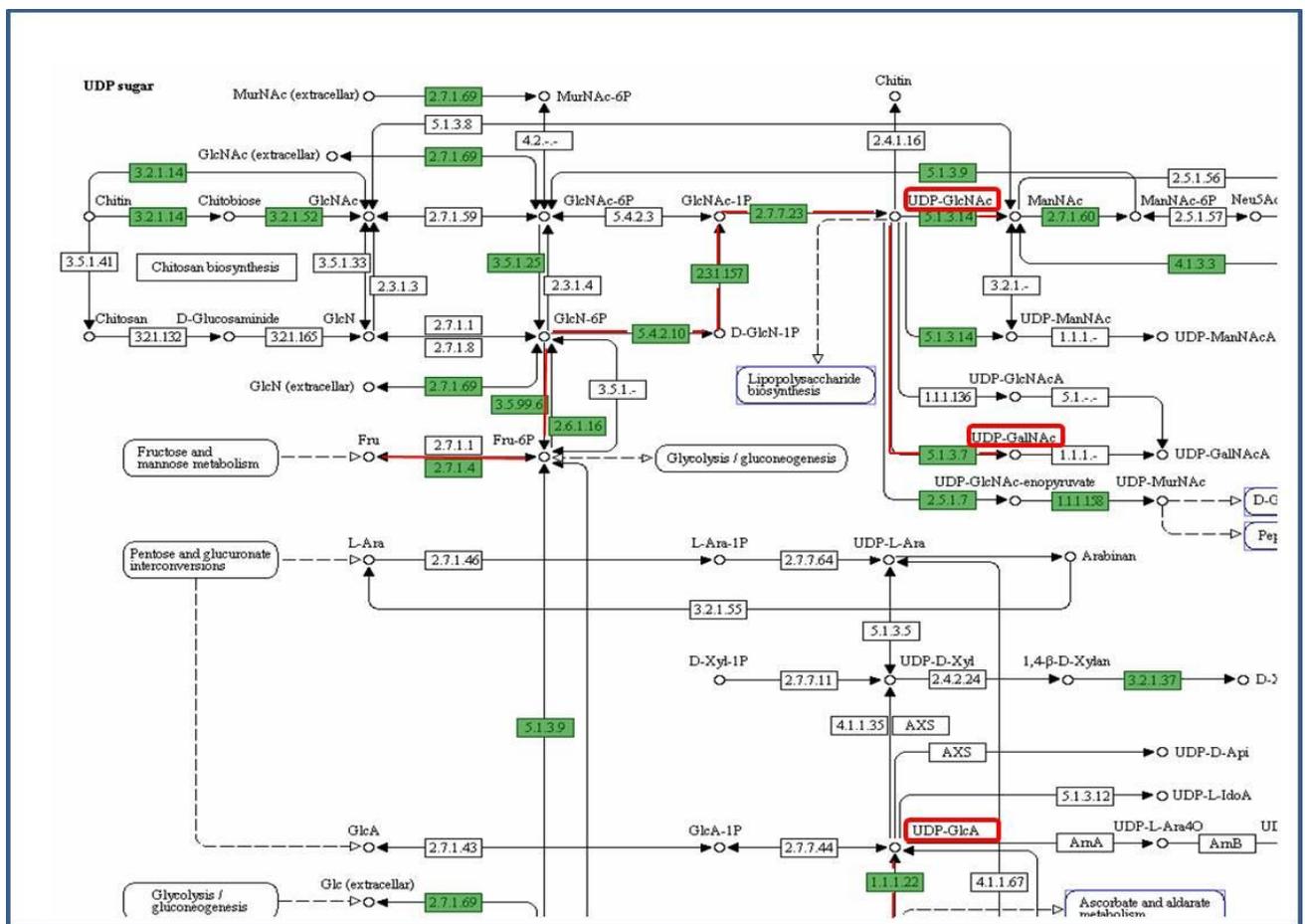


Figure 42 : Partie du réseau métabolique d'*E.coli* str. K-12 substr. DH10B concernant la synthèse des sucres aminés et activés. (source: site « The SEED Viewer » <http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi>).

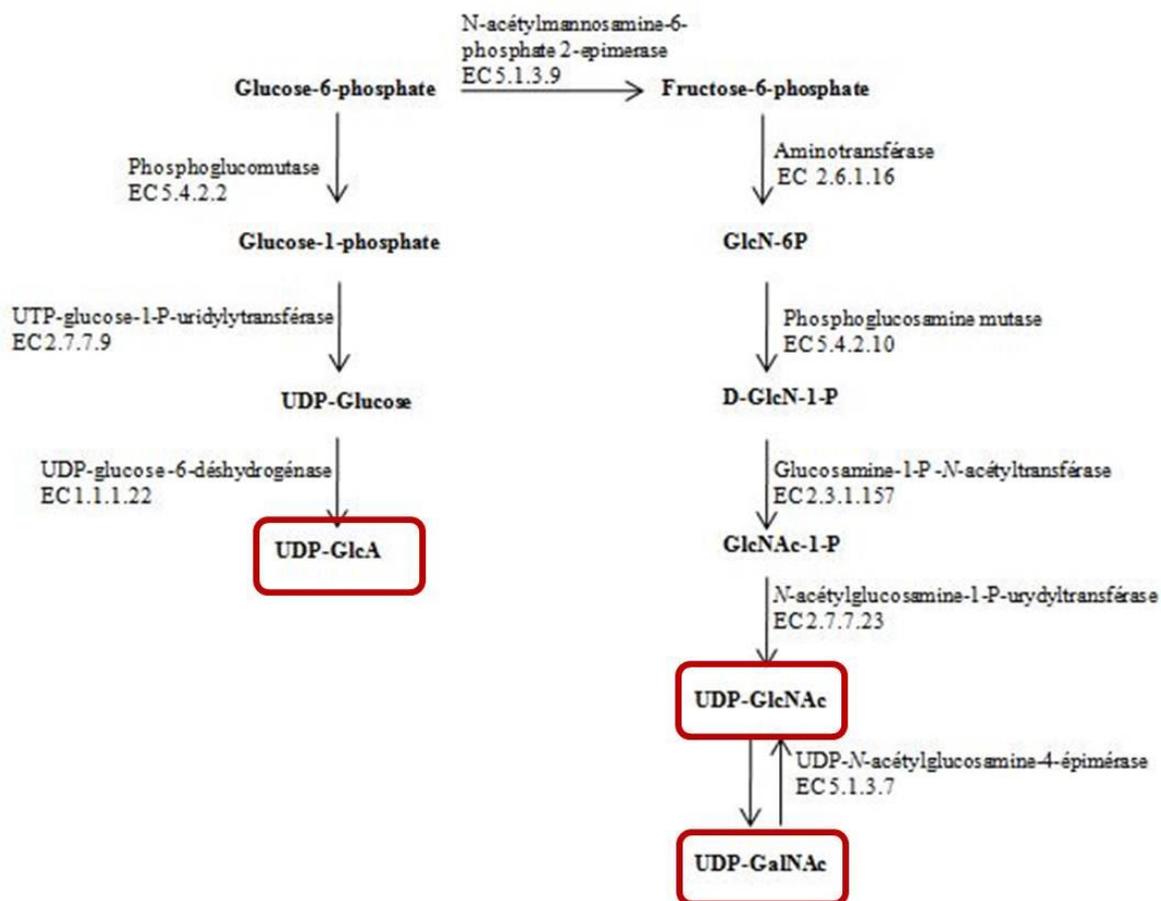


Figure 43 : Voies de biosynthèse des précurseurs GlcA, GlcNAc et GalNAc de l'EPS HE800 chez *E.coli* str. K-12 substr. DH10B (d'après « The SEED viewer »).

Les deux souches contenant les deux plasmides ont été remises en cultures, et les plasmides pWKS-*wbpP* et pBBR-*KfiD* ont été extraits (Figure 44).

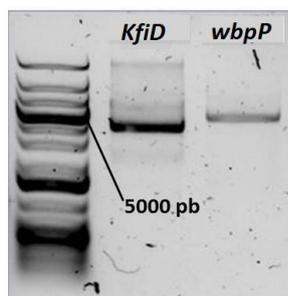


Figure 44 : Extraction des plasmides pBBR-*KfiD* et pWKS-*wbpP*.

La transformation simultanée du clone 92 avec les plasmides pWKS-*wbpP* et pBBR-*kfiD* a été effectuée à deux reprises, une première fois avec des bactéries fraîchement préparées, et la seconde avec les bactéries préparées et stockées à -80°C , sans résultat. L'expérience a été réitérée avec des bactéries fraîchement préparées, le clone 92 a été transformé cette fois

séparément avec les plasmides pWKS-wbpP et pBBR-KfiD. Après une incubation sur le weekend, un clone a été obtenu, 92-kfiD.

Le clone 92-KfiD a été remis en culture, et transformé avec le plasmide pWKS-wbpP. Au bout d'une nuit, aucun clone n'était visible, le reste de la culture d'expression a alors été intégralement étalé sur boîte, de petites colonies ont alors poussé au bout de deux jours. Des amorces ont été dessinées afin de vérifier les clones obtenus, à partir des séquences du gène *kfiD* d'*E.coli* K5 (GI 735963) et du gène *wbpP* de *Pseudomonas aeruginosa* (GI 6690131) (Tableau IV). Ces amorces ont permis de valider les clones 92-KfiD et 92-KfiD- wbp.

Les expériences concernant la modification du clone recombinant 92, avec les gènes *kfiD* et *wbpP*, n'ont pas été poursuivies à ce stade, en raison de l'identification du rôle probable de SypG dans la production d'EPS (voir chapitre II, 6).

F. Expression du cluster HE800

Le cluster HE800 de *V. diabolicus* est responsable de la biosynthèse de l'EPS HE800 (Figure 45). Ce cluster de biosynthèse a été cloné chez *E.coli* Epi100. Parmi les 5 clones obtenus et dont les clusters ont été séquencés, le clone 92 a été retenu. Les expériences présentées dans les paragraphes précédents montrent qu'en conditions de culture normalement favorables à la production de polysaccharide, le clone 92 ne produit pas l'EPS HE800. L'absence d'expression du cluster HE800 chez *E.coli* est l'une des hypothèses envisagées pour expliquer ces résultats. Afin de vérifier l'expression des gènes du cluster, les souches *V. diabolicus* et le clone 92 ont donc été placés en conditions de culture propices à la production d'EPS, puis le niveau de transcription de chaque gène (*sypR*, *sypQ*...) du cluster a été comparé chez *V. diabolicus* et chez le clone 92. Le gène codant pour la GAPDH a été utilisé afin de normaliser les résultats.

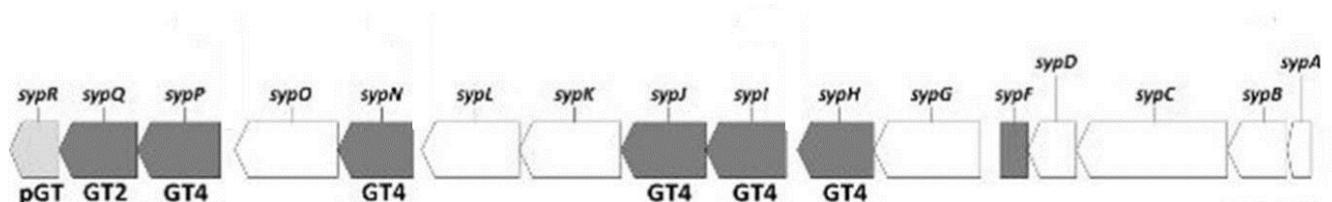


Figure 45 : Rappel de la composition et de l'organisation du cluster de gènes associé à la biosynthèse de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus*, d'après Goudenège (Goudenege et al., 2014).

1. Préparation des amorces

Une paire d'amorces a été dessinée et évaluée *in silico* pour chaque gène du cluster ; chaque paire a été nommée par une lettre correspondant à un gène du cluster (Q = *sypQ*, P = *sypP* etc...)(Tableau IV). Une paire d'amorces a également été dessinée pour le gène codant la GAPDH de chaque organisme (Tableau IV). La taille des amplicons attendus est comprise entre 110 et 220 paires de bases. La spécificité de chaque paire d'amorces a été vérifiée par PCR sur les ADN génomiques de *V. diabolicus* et de la souche *E. coli* Epi100.

2. Expression du cluster chez *V. diabolicus* et chez le clone 92

V. diabolicus et le clone 92 ont été cultivés respectivement en milieu Zobell et LB, supplémentés en glucose à la teneur de 30 g/L. Les échantillons ont été prélevés au bout de 10 heures de culture. Les résultats sont exprimés en RQ (quantification relative). Cette valeur caractérise une variation de l'expression d'un gène entre deux échantillons : par exemple, une valeur de RQ de 3,9 signifie que le gène *sypQ* est 3,9 fois plus transcrit chez le clone 92 que chez *V. diabolicus*, dans les conditions étudiées (Figure 46).

Selon les résultats obtenus, les gènes d'une partie du cluster (*sypQ* à *sypH*) présentent des niveaux de transcription entre 1,8 et 5,6 fois plus élevés chez le clone 92 que chez *V. diabolicus* (Figure 46). Les gènes de *sypG* à *sypA* présentent des niveaux de transcription plus faible (-3,7 à -25 fois moins) chez le clone 92, par rapport à *V. diabolicus*. Les résultats concernant *sypR* ne sont pas analysables, les Ct obtenus (nombres de cycles d'amplification nécessaires pour que le signal émis par l'ADNc du gène étudié soit supérieur à une valeur seuil fixée au préalable) sont trop élevés pour être pris en considération, les amorces correspondantes sont probablement peu adaptées.

Les principaux points à retenir de cette expérience sont que, chez le clone 92, les gènes ne sont pas exprimés de la même façon que chez *V. diabolicus* et surtout, le gène *sypG* est particulièrement sous-exprimé, en comparaison avec *V. diabolicus*. Or *sypG* code un régulateur de transcription, et sa sous-expression pourrait fortement altérer l'activité du cluster. Ce résultat a été confirmé par de nouvelles mesure du niveau de transcription de ce gène chez *V. diabolicus* et le clone 92. A chaque nouvel essai, le niveau d'expression de *sypG* chez le clone 92 était 40 et 50 fois inférieur à celui chez *V. diabolicus*.

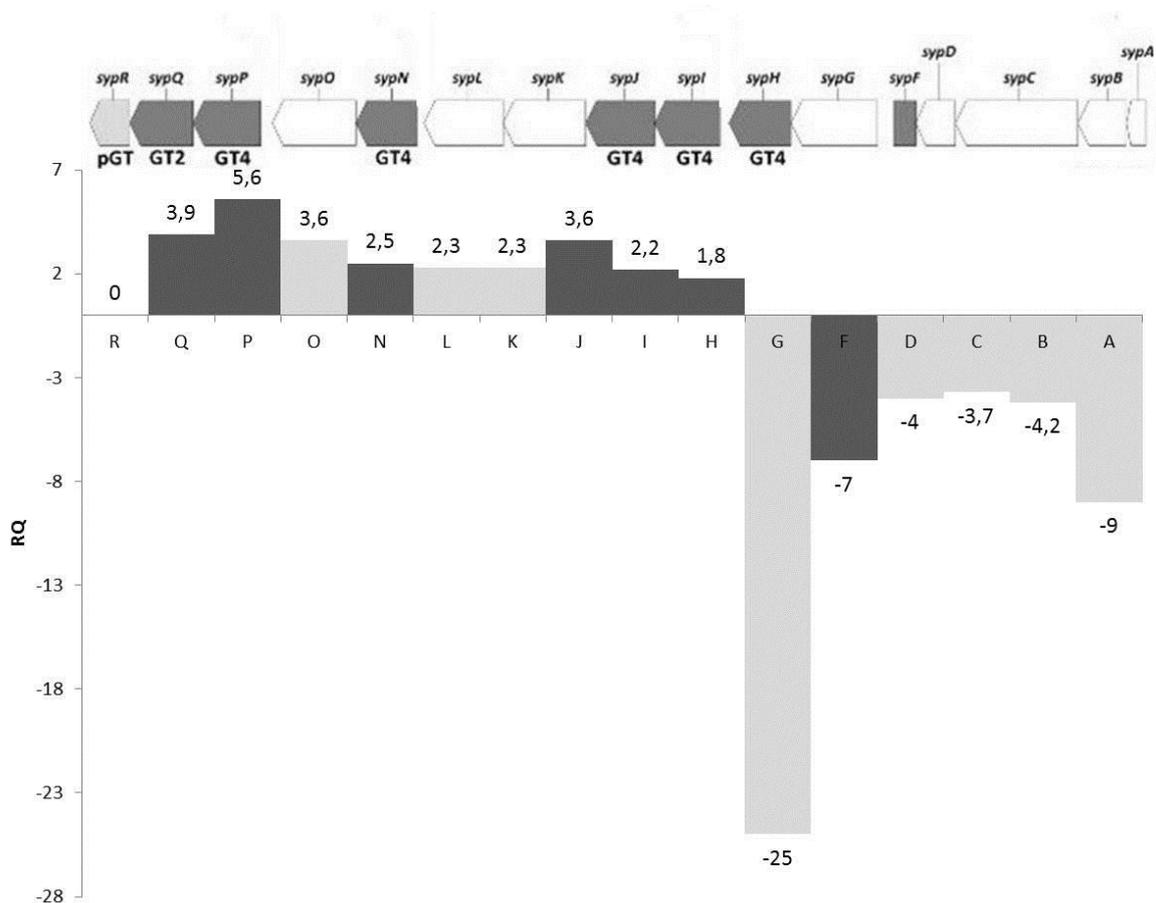


Figure 46 : Niveaux de transcription du cluster HE800 chez le clone 92 par rapport à *Vibrio diabolicus*, au bout de 10 heures de cultures. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3. Recherche de sites de fixation pour les régulateurs de réponse SypG et SmcR sur le cluster HE800

SypG est un régulateur de réponse hautement conservé chez quatre organismes, *V. fisheri*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae* (Yip et al., 2005). Chez *V. fisheri*, SypG induit la transcription du cluster *syp* en se fixant à une séquence conservée de 22 pb, ou motif G, située en amont (50 à 90 pb) de chacun des promoteurs (Ray et al., 2013). Chez *V. vulnificus*, chez qui SypG est également conservé, la transcription du cluster est pourtant activée par SmcR, un régulateur lié au quorum sensing, SmcR se fixe à un site localisé en amont du site d'initiation de la transcription du cluster (146-125 pb) (Lee et al., 2013).

Les séquences consensus pour la fixation de SypG (TTCTCANNNTGAGAA) et de SmcR (TTATTGATNNNNTNNTNAATAA) (Figure 11) ont été recherchées dans les régions intergéniques du cluster HE800, en aval de *sypP*, *sypN*, *sypH* et *sypA*, ces zones correspondent à celles où les promoteurs putatifs ont été identifiés chez *V. fischeri* (Figure 47). Une recherche a également été effectuée en aval de *sypG*, en raison de la présence d'une région intergénique sur le cluster HE800.

Ainsi, 5 motifs correspondant à la séquence consensus pour la fixation de SypG, ont été identifiés sur le cluster de *V. diabolicus* (Figure 47). Ces motifs sont situés entre 110 et 130 paires de bases en amont de *sypP*, *sypN*, *sypI*, *sypG* et *sypA* (ces séquences sont plus proches chez *V. fischeri*, 50 à 90 pb). En ce qui concerne le motif de fixation de SmcR, sa présence n'a pas été identifiée.

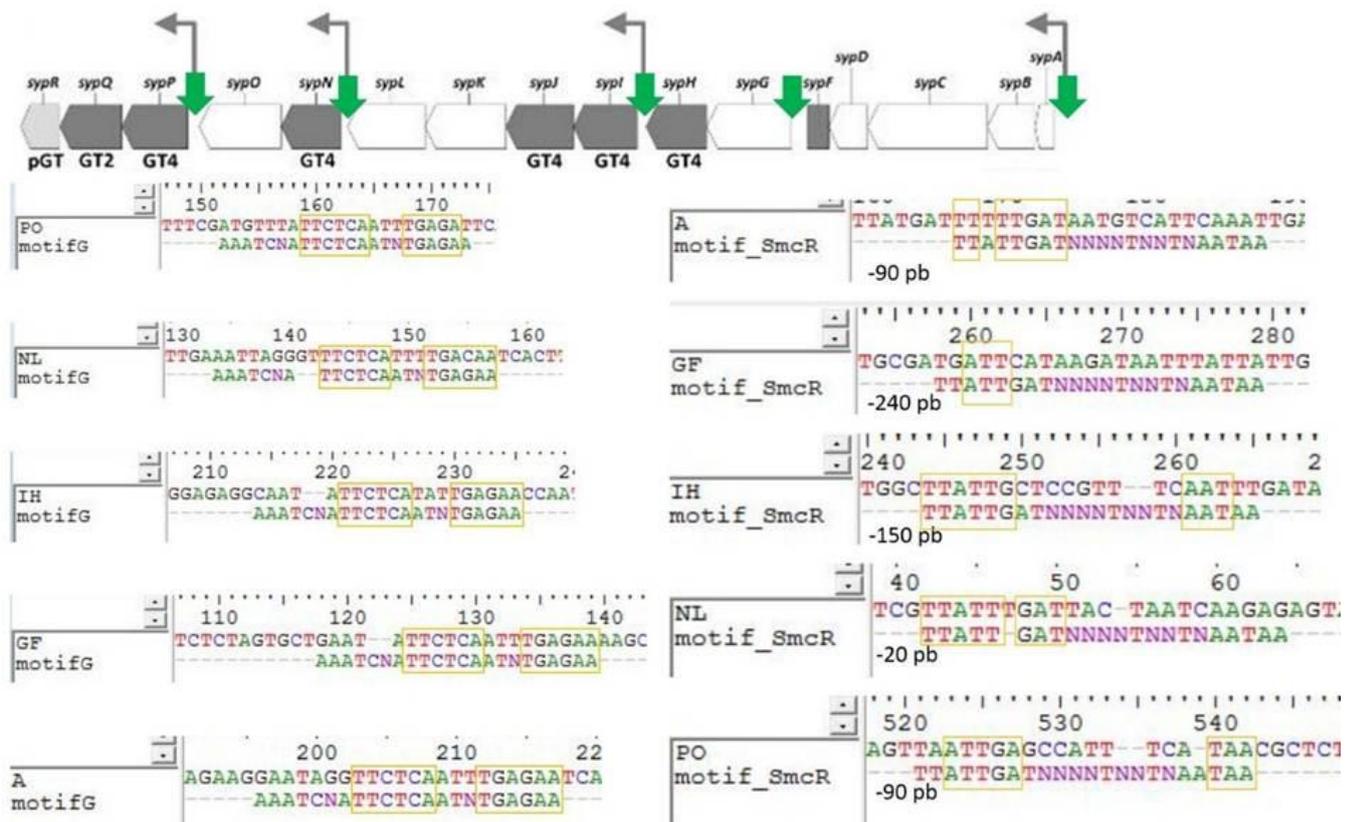


Figure 47 : Recherche des séquences consensus pour la fixation de SypG (à gauche) et SmcR (à droite) en aval de *sypP*, *sypN*, *sypH*, et *sypA* sur le cluster HE800.

Compte-tenu des résultats de la première expérience (Figure 46), ainsi que de l'identification des 5 motifs similaires au motif G sur le cluster de l'EPS HE800 (Figure 47), une étude approfondie des niveaux de transcription de *sypG* a été envisagée.

4. Construction du mutant 92sypG

Compte tenu de l'importance potentielle de *sypG* pour la régulation du cluster HE800 de *V. diabolicus*, et sa sous-expression chez *E. coli*, l'étude de l'influence d'une complémentation en *sypG* chez le clone 92 a été réalisée. Le plasmide commercial pSF-OXB18 (500/700 copies par cellule) a été sélectionné (Tableau III). Il permet une expression constitutive du gène cloné grâce à la présence d'un promoteur fort chez *E. coli*. Le dessin d'amorces, comportant les sites de restriction EagI et EcoRV, destinées à amplifier *sypG*, ont permis son clonage dans le vecteur pSF-OXB18 (Tableau IV). Le clone 92 a ensuite été transformé avec le plasmide pSF-OXB18-*sypG*. La présence de ce plasmide a été vérifiée chez le mutant 92sypG avec les amorces correspondantes (Tableau IV).

5. Expression du cluster chez *V. diabolicus*, le clone 92, le clone 92sypG et GV723

Le laboratoire dispose du clone GV723 (prêté par Frédérique Le Roux) ; il s'agit d'un mutant de *V. diabolicus*, portant un exemplaire supplémentaire de *sypG*, sur un vecteur comportant un promoteur d'expression constitutive.

a) Comparaison des niveaux de transcription de *sypG* chez *V. diabolicus* et le mutant GV723, mise en évidence d'une régulation de *sypG*.

L'intérêt de cette expérience est de comparer les niveaux de transcription du gène *sypG* entre *V. diabolicus* et GV723 au bout de 5, 10 et 24 heures de cultures, afin d'étudier la variation du niveau de transcription de *sypG* au cours du temps chez ces deux organismes. *V. diabolicus* et GV723 ont été cultivés en milieu zobell supplémenté en glucose à la teneur de 30 g/L pendant 24 heures. Davantage de transcrits de *sypG* sont produits chez GV723, en comparaison avec *V. diabolicus*, le gène *sypG* est donc bien surexprimé chez ce mutant (Figure 48). Au bout de 24 heures, *sypG* est transcrit 3,8 fois plus chez GV723, en comparaison avec *V. diabolicus* (Figure 48). Il serait intéressant de caractériser sa production d'EPS ; en effet chez *V. fischeri*, l'ajout d'un exemplaire de *sypG* chez la souche sauvage a permis d'augmenter de 3,5 fois sa capacité à former un biofilm (E. S. Yip et al., 2005).

Chez *V. diabolicus*, le niveau de transcription de *sypG* n'est pas constant (Figure 49), Il augmente au cours de la phase exponentielle de croissance, puis diminue. Ce niveau est presque

4 fois plus élevé à 10 heures qu'à 24 heures de culture. Le même phénomène est observé chez GV723 (Figure 49). Chez *V. diabolicus*, le niveau de transcription de *sypG* semble donc soumis à une régulation au cours du temps.

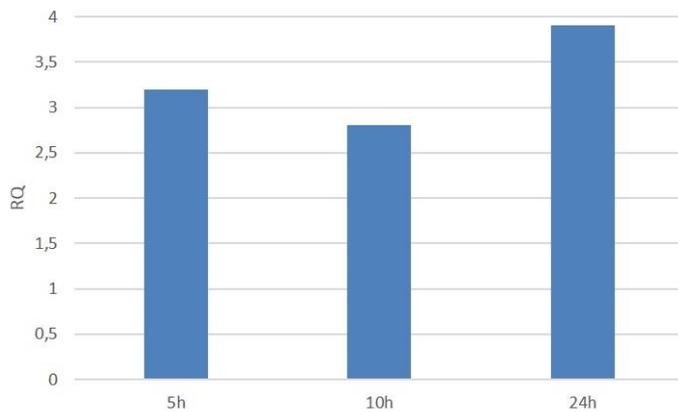


Figure 48 : Niveaux de transcription de *sypG* chez GV723 par rapport à *V. diabolicus* au bout de 5, 10 et 24 heures de culture. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

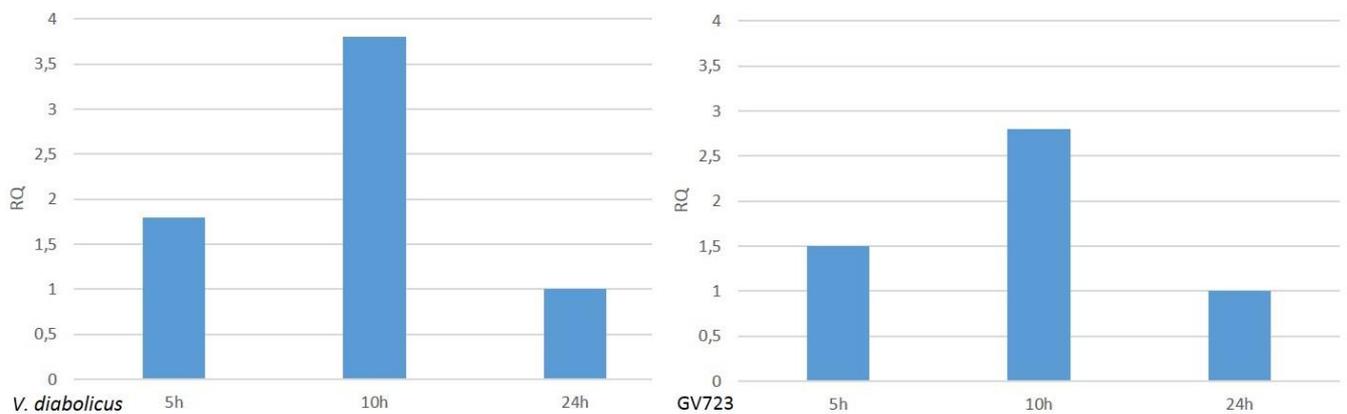


Figure 49 : Profils de transcription de *sypG* chez *V. diabolicus* à gauche, et GV723 à droite (La valeur de RQ de 1 a été attribuée au niveau de transcription à 24 heures, afin de pouvoir exprimer ceux relevés à 5 et 10 heures par rapport à cette valeur). $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

b) Comparaison des niveaux de transcription des gènes placés devant les motifs G chez le clone 92 et le clone 92sypG , mise en évidence de la fixation de SypG.

Le niveau de transcription de *sypG* a été comparé chez le clone 92 et le clone 92sypG, au bout de 10 heures de culture. Le niveau de transcription de *sypG* chez 92sypG était alors 1500 fois supérieur à celui observé chez le clone 92, ce qui constitue une validation supplémentaire du clonage réalisé.

Les niveaux de transcription des gènes placés en aval des motifs G identifiés précédemment (Figure 47), ont alors été comparés chez le clone 92 et le clone 92sypG, au bout de 10 heures de culture. Il s'agit des gènes *sypA*, *sypG*, *sypI*, *sypN* et *sypP*.

L'établissement de la transcription de *sypG* chez le clone 92sypG a permis d'augmenter les niveaux de transcription (entre 2 et 5 fois plus) des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP*, par comparaison avec le clone 92 (Figure 50)., ce qui semble confirmer que *sypG* régule le cluster de l'EPS HE800 via ces séquences.

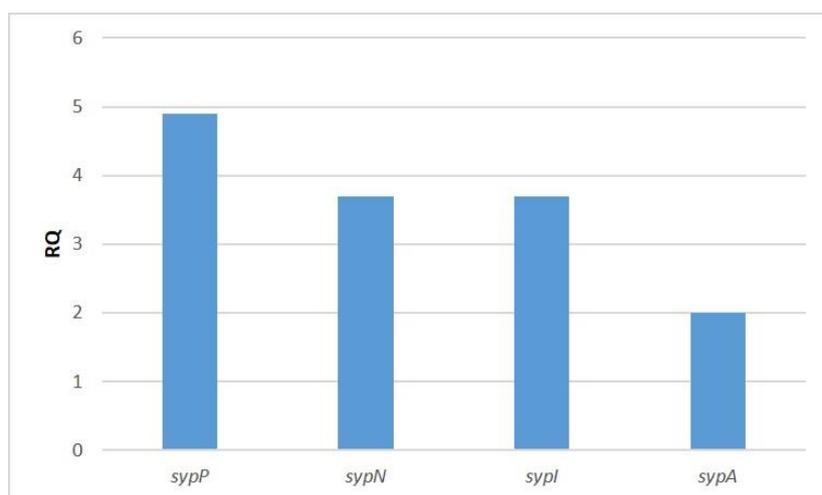


Figure 50 : Niveaux de transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP* chez le clone 92sypG en comparaison avec le clone 92 (Le niveau de transcription de *sypG* n'est pas indiqué ; 3500 fois supérieur chez 92 sypG en comparaison avec le clone 92). $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

c) Comparaison des niveaux de transcription de *sypG* chez *V. diabolicus* et chez le clone 92*sypG* en comparaison avec *V. diabolicus*, mise en évidence d'une différence de régulation.

Chez *V. diabolicus*, *sypG* est régulé au cours du temps (Figure 51 A), ce qui n'est pas le cas chez le clone 92*sypG* (Figure 51 B). Au bout de 5 heures de culture, le niveau d'expression de *sypG* chez le clone 92*sypG* est 8 fois inférieur à celui observé chez *V. diabolicus*, alors qu'il lui est 900 fois supérieur au bout de 24 heures de culture (Figure 51 B).

Cette différence de régulation pourrait être un obstacle à la production de polysaccharide par le clone 92*sypG*. En effet, chez *S. zooepidemicus*, une régulation de l'opéron *has*, responsable de la synthèse de l'acide hyaluronique, a été mise en évidence. En phase exponentielle précoce et tardive (4 et 8 heures de culture), les niveaux de transcription de cet opéron sont plus élevés qu'au milieu de la phase exponentielle (6 heures). Les clones recombinants réalisés chez *L. lactis* (portant des gènes de l'opéron *has*) sont dénués de cette régulation, et produisent moins d'acide hyaluronique que *S. zooepidemicus* (Prasad, Ramachandran, & Jayaraman, 2012).

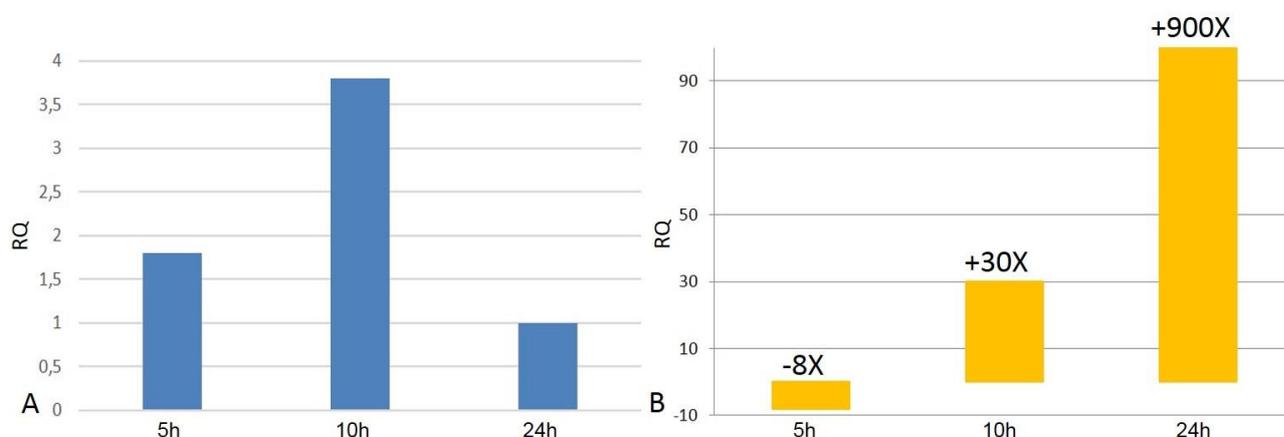


Figure 51 : Profil de transcription de *sypG* chez *V. diabolicus* (A) (La valeur de RQ de 1 a été attribuée au niveau de transcription à 24 heures, afin de pouvoir exprimer ceux relevés à 5 et 10 heures par rapport à cette valeur), et niveaux de transcription de *sypG* chez le clone 92*sypG*, en comparaison avec *V. diabolicus*. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

d) Profil de transcription des gènes du cluster HE800 chez *V. diabolica* et les clones 92sypG et 92.

Une nouvelle étude des niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 a été réalisée sur *V. diabolica*, et les clones 92sypG et 92. Cette étude a été réalisée en triplicatas et sur tous les gènes du cluster (nouvelles amorces sypR2 pour *sypR*, Tableau IV), au bout de 5, 10 et 14h30 de culture.

Le but était d'apporter davantage d'information sur les profils de transcription du cluster chez ces 3 organismes, et également confirmer les résultats concernant l'induction des gènes cibles *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP*, par l'établissement de la production de SypG chez le clone 92sypG, en comparaison avec le clone 92.

Malheureusement, la concentration en glucose des milieux de culture s'est avérée être à 60 g/L au lieu de 30 g/L.

Les niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 ont été comparés chez *V. diabolica* et le clone 92, afin de vérifier si les résultats obtenus confirmaient les différences de transcription observées précédemment chez ces 2 organismes (Figure 46).

Le profil de transcription issu de la comparaison de *V. diabolica* et du clone 92 au bout de 10 heures de cultures est cohérent avec les résultats précédents (Figure 46). Les gènes de *sypG* à *sypA* affichent en effet des niveaux de transcription plus élevés chez *V. diabolica*, en comparaison avec le clone 92 (Figure 52). Cette différence semble conservée au bout de 5 et 14h30 de culture, même si elle semble moins marquée (Figure 52).

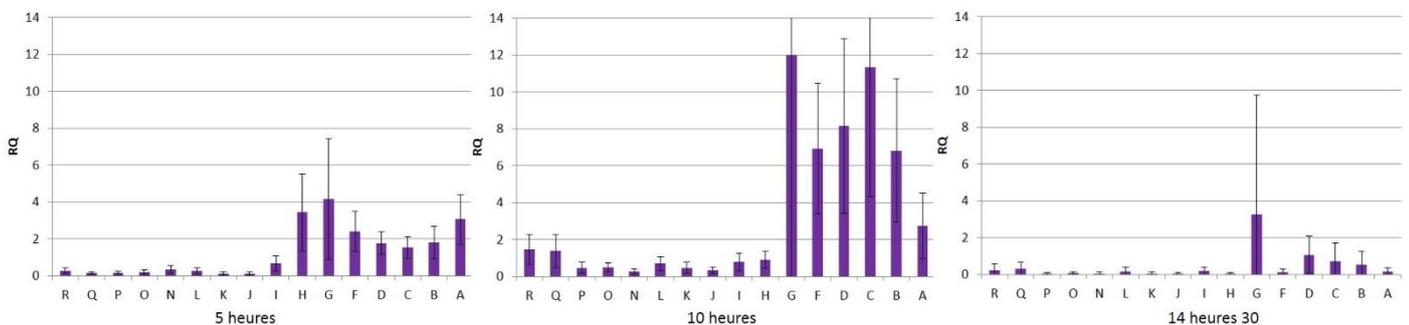


Figure 52 : Niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 chez *V. diabolica*, en comparaison avec le clone 92, au bout de 5, 10 et 14 heures 30 de culture, glucose 60 g/L. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Il a été observé, au bout de 10 heures de culture, que l'établissement de la transcription de *sypG* chez le clone 92sypG avait permis d'augmenter les niveaux de transcriptions (entre 2 et 5 fois plus) des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP*, en comparaison avec le clone 92 (Figure 50). Lors de cette expérience, le niveau de transcription de *sypG* était 3500 fois supérieur chez 92sypG en comparaison avec le clone 92 (Figure 50).

L'induction de la transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP*, chez le clone 92sypG par rapport au clone 92 n'est ici pas significative, que ce soit au bout de 5, 10 ou 14h30 de cultures (Figure 53). Différentes hypothèses sont envisagées pour expliquer cela.

D'une part, la teneur en glucose des milieux de culture étaient à 60 g/L, soit le double en comparaison avec la teneur à 30 g/L qui avait été utilisée jusqu'alors. Une teneur en glucose à 60 g/L pourrait avoir entraîné la variation des résultats.

D'autre part, il est possible que le niveau de transcription de *sypG* doive être borné à des valeurs particulières chez le clone 92sypG, afin d'observer une induction de la transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP*, par rapport au clone 92.

En effet, au cours de cette expérience (Figure 53), le niveau de transcription de *sypG*, au bout de 5, 10 et 14h30 de culture, était 240, 5360 et 9670 fois respectivement supérieur chez 92sypG, en comparaison avec le clone 92.

Or lors de la première expérience (Figure 50), ce niveau était 3500 fois supérieur chez 92sypG, en comparaison avec le clone 92, et les expériences précédentes ont démontré que le niveau de transcription de *sypG* était vraisemblablement régulé au cours du temps chez *V. diabolicus* (Figure 49).

De plus, il a été démontré chez *V. fischeri* qu'une trop forte induction de *sypG* pouvait inhiber la formation de biofilm (Morris & Visick, 2013). Dans ce cas l'inhibition est réalisée via le rôle du régulateur SypE ; absent chez *V. diabolicus*, une possible inhibition de l'expression du cluster HE800, en réponse à la surexpression de SypG n'était donc pas prévisible.

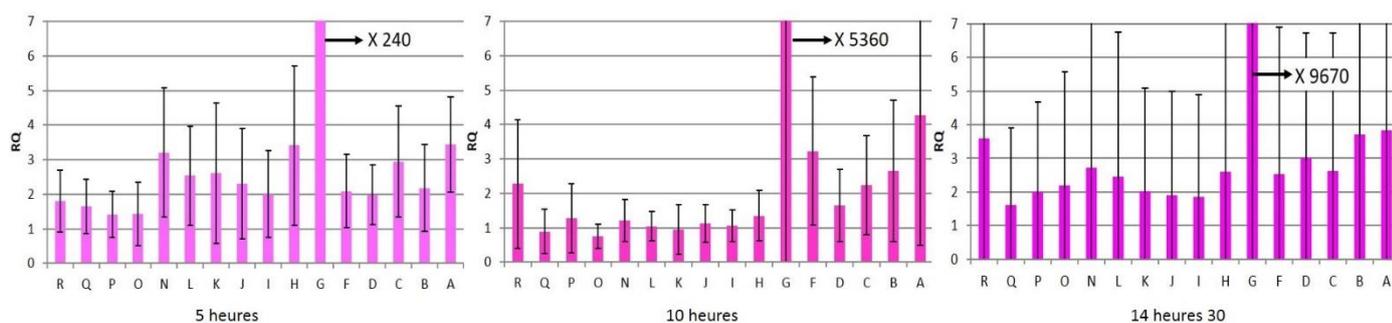


Figure 53 : Niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 chez le clone 92sypG, en comparaison avec le clone 92, au bout de 5, 10 et 14 heures 30 de culture, glucose 60 g/L. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

*e) Comparaison des niveaux de transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP* chez les clones 92sypG et 92, en fonction du niveau de transcription de *sypG*.*

Une cinétique en milieu LB glucose 30 g/L du niveau de transcription de *sypG* chez le clone 92sypG et le clone 92 a été menée. Le but était de se replacer dans les conditions où l'induction de la transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN* et *sypP*, avait été observée chez le clone 92sypG, en comparaison avec le clone 92 (Figure 50).

Se placer dans ces conditions n'a pas été chose aisée ; en effet, une première cinétique a été réalisée, les prélèvements ont été effectués au bout de 5, 7h30 et 10 heures de culture. Les niveaux de transcriptions de *sypG* ont alors été de 290 fois à 27 550 fois supérieurs chez 92sypG par rapport au clone 92. Une seconde cinétique a alors été réalisée, les prélèvements ont été effectués au bout de 5, 6, 7 et 8 heures de culture. Cette fois, les niveaux de transcription de *sypG* ont alors été de 260 fois à 800 fois supérieurs chez 92sypG, en comparaison avec le clone 92. Ces variations ne semblaient pas corrélées à la croissance cellulaire.

La troisième cinétique (Figure 54), avec des prélèvements effectués toutes les heures, à partir de 6 heures, jusqu'à 12 heures de cultures, a permis d'obtenir une surexpression voisine de celle observée dans la figure 50.

Au bout de 10, 11 et 12 heures de culture, une induction de la transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN*, *sypP* et *sypR* est observée chez 92sypG par rapport au clone 92 (Figure 54). Le niveau de transcription de *sypG* était respectivement 2490, 6900 et 1110 fois supérieur chez 92sypG, en comparaison avec le clone 92. Au bout de 11 heures de culture, les gènes *sypA*,

sypI, *sypN*, *sypP* et *sypR* sont 8 à 27 fois plus transcrits chez le clone 92sypG que chez le clone 92 (Figure 54), ce qui confirme les résultats précédents (Figure 50).

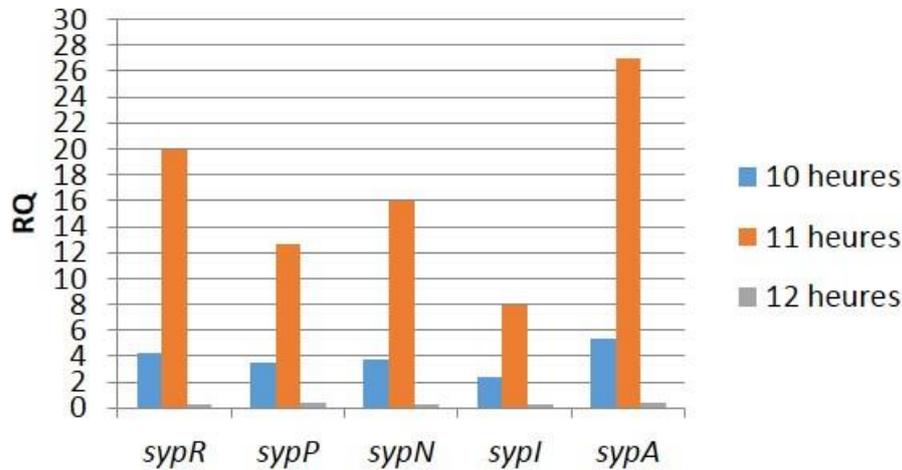


Figure 54 : Niveaux de transcription des gènes *sypA*, *sypI*, *sypN*, *sypP* et *sypR* chez le clone 92sypG, en comparaison avec le clone 92, au bout de 10, 11 et 12 heures de cultures. Le niveau de transcription de *sypG* était respectivement 2490, 6900 et 1110 fois supérieur chez 92sypG, en comparaison avec le clone 92. Glucose 30 g/L. $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Se placer à un certain niveau d'expression de *sypG* pour observer cette induction des gènes cibles, chez le clone 92sypG, par rapport au clone 92, n'apparaît pas comme une explication suffisante. En effet, cette induction a été observée ici dans le cas où le niveau de transcription de *sypG* était 2490 et 6900 fois supérieur chez 92sypG par rapport au clone 92 (Figure 54). Or, dans l'expérience précédente (Figure 53) réalisée en triplicata, un niveau de transcription de *sypG* intermédiaire entre ces deux valeurs (le niveau de transcription de *sypG* était 5360 fois supérieur chez 92sypG par rapport au clone 92), n'avait pas permis de visualiser cette induction (Figure 53). Cette différence ne peut être expliquée par la variation de concentration en glucose entre les 2 expériences. En effet, dans la dernière expérience (Figure 54), effectivement réalisée à une concentration en glucose de 30 g/L, au bout de 9 heures de culture, le niveau de transcription de *sypG* était 3440 fois supérieur chez 92sypG par rapport au clone 92, ce qui est très proche de la toute première expérience (Figure 50), et aucune induction des gènes cibles n'a été observée.

Il est également curieux d'observer des variations du niveau de transcription de *sypG* chez 92sypG par rapport au clone 92, si importantes entre des durées de culture similaires. De plus ces variations ne sont pas toujours croissantes (Figure 54).

La régulation du cluster HE800 ne semble pas dépendre que de l'expression de *sypG*, d'autres facteurs inconnus sont probablement impliqués.

f) Mise en évidence de la fixation de SypG sur les motifs précédemment identifiés chez V. diabolicus.

Compte-tenu de la versatilité des résultats obtenus par rt-qPCR concernant la régulation du cluster HE800 par *sypG* chez *V. diabolicus*, une autre stratégie a été élaborée pour mettre en évidence cette régulation. Chez *V. fischeri*, la fixation de SypG sur les motifs identifiés a été mise en évidence (V. A. Ray et al., 2013).

Une expérience de gel retard a donc été envisagée pour mettre en évidence la fixation de SypG sur les motifs précédemment identifiés chez *V. diabolicus* (Figure 47). Un mutant producteur de la protéine SypG a été réalisé (Tableau II), par clonage de *sypG* dans le vecteur pET-SUMO (Tableaux III et IV). Cette construction a été vérifiée par PCR (Tableau IV), des amorces destinées à amplifier des séquences du cluster HE800 comprenant les motifs de fixation de SypG ont été testées (Tableau IV). Un test de production de la protéine SypG par le mutant réalisé a été effectué selon les directives du kit Champion™ pET Sumo Expression System (Thermo Fisher Scientific), ce qui a permis de visualiser SypG sur gel (Figure 55).

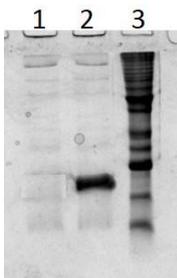


Figure 55 : Extraits intracellulaires de la souche *E. coli* BL21(DE3)-*sypG* colorés au bleu de Coomassie au bout de 24 heures de culture. Extraits intracellulaires en milieu LB (1), Extraits intracellulaires en milieu LB IPTG 1mM (2), marqueur de taille (3).

G. Tests de production par le clone 92sypG .

Enfin, le clone 92sypG a été soumis à des tests de production, afin de vérifier si la surexpression de *sypG* permettait d'établir la production d'EPS HE800.

1. Analyse du surnageant de culture et du contenu intracellulaire du clone 92sypG

a) En milieu LB

Le clone recombinant 92sypG a été soumis à un test de production en milieu LB glucose 30 g/L pendant 48 heures à 37°C sous agitation (400 mL de culture). La culture a été traitée comme précédemment. Le culot a été repris dans 5 mL d'eau ultrapure. Les aliquots ont été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose et de polyacrylamide, avant d'être colorés au Stains-All (Figure 56). Le surnageant, concentré par ultrafiltration, a été lyophilisé, une minuscule pellicule est observable au fond du tube, le mutant 92sypG ne semble pas produire d'EPS extracellulaire.

L'analyse électrophorétique et la coloration au Stains-All n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'un EPS dans le surnageant de culture (Figure 56). Une coloration violette est visible pour les extraits intracellulaires (Figure 56), déjà observée lors d'expériences antérieures (Figure 36), elle n'était pas révélatrice de la présence de l'EPS recherché. Il est possible que la souche hôte ne produise pas suffisamment de précurseurs disponibles pour la synthèse de l'EPS, que l'export du polymère ne soit pas effective, ou encore que les protéines issues du cluster recombinant ne soient pas fonctionnelles.

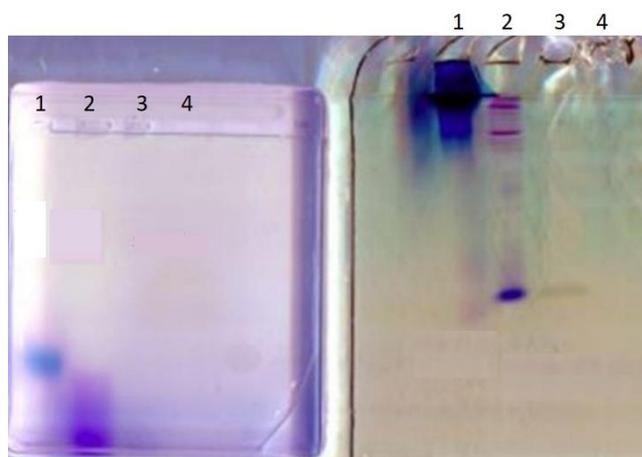


Figure 56 : Coloration au Stains-All des extraits intracellulaires et extracellulaires du clone 92sypG sur gel d'agarose à gauche, et sur gel de polyacrylamide à droite. Témoin HE800 (1), extrait intracellulaire (2), surnageant de culture (3), surnageant de culture ultrafiltré (4).

b) Test de précipitation des polysaccharides

Le clone 92sypG a été soumis à un nouveau test de production en milieu LB glucose 30 g/L, pendant 48 heures, le surnageant de culture a été traité selon le protocole en vigueur au laboratoire pour la précipitation de polysaccharides.

Le mélange échantillon – éthanol et sel a été conservé 2 jours à -20°C avant la centrifugation, mais aucun culot n'a été observé lors de l'étape finale. Aucun EPS n'a donc été mis en évidence lors de cette expérience.

c) En milieu R

Le clone 92sypG a été cultivé en milieu R, supplémenté en concentrations différentes de fructose, ou d'acide glucuronique, *N*-Acétylglucosamine et *N*-Acétylgalactosamine, afin de recréer les conditions de cultures propices à la production d'un polysaccharide composé de ces éléments (Restaino et al., 2013)(Tableau XXIII).

Tableau XXIII : Composition des milieux de cultures testés pour l'effet de la supplémentation en sucres composant le HE800 notamment, sur la production d'un EPS par le clone 92sypG

culture	milieu	supplémentation
A	R	acide glucuronique 0,385 mM + (<i>N</i> -Acétylglucosamine + <i>N</i> -Acétylgalactosamine) 0,190 mM
B	R	acide glucuronique 0,770 mM + (<i>N</i> -Acétylglucosamine + <i>N</i> -Acétylgalactosamine) 0,380 mM
C	R	fructose 0,385 mM
D	R	fructose 0,770 mM

Les extraits intracellulaires et extracellulaires obtenus à partir de ces cultures ont été déposés sur gel d'agarose et colorés au Stains-All (Figure 57).

Pour les extraits intracellulaires et extracellulaires (puits 2 à 9), une coloration jaune est observée, à la même hauteur sur le gel que la coloration de l'EPS HE800. Une telle coloration a déjà été observée (Figure 36), mais n'avait pu être reliée à l'EPS recherché. Les extraits intracellulaires (puits 6 à 9) présentent également une coloration violette. Cette coloration indique la présence d'acides nucléiques. Si l'EPS recherché est présent dans ces échantillons, il l'est en bien trop faible quantité pour être détecté par cette coloration (Figure 57).



Figure 57 : Electrophorèse en gel d'agarose et coloration au Stains-All des produits du test de production du clone 92sypG en milieu R. Témoin HE800, surnageant de culture A (2), surnageant de culture B (3), surnageant de culture C (4), surnageant de culture D (5) , extraits intracellulaires de la culture A (6), extraits intracellulaires de la culture B (7), extraits intracellulaires de la culture C (8), extraits intracellulaires de la culture D (9).

Un second gel a été effectué, avec les extraits intracellulaires, afin de caractériser la présence d'ADN avec le SYBR™ safe avant la coloration au Stains-All (Figure 58). La présence d'acides nucléiques (Figure 58 A) interfère avec la coloration au Stains-All (Figure 58 B). Le HE800 n'est pas présent dans ces échantillons, car aucune coloration n'est observée à la même hauteur que le témoin HE800 (Figure 58 B). Il est possible qu'un polymère de plus petite taille soit produit, et que sa coloration soit superposée à celle des acides nucléiques, en effet la coloration au Stains-All semble plus intense (Figure 58 B) que celle au SYBR™ safe (Figure 58 A).

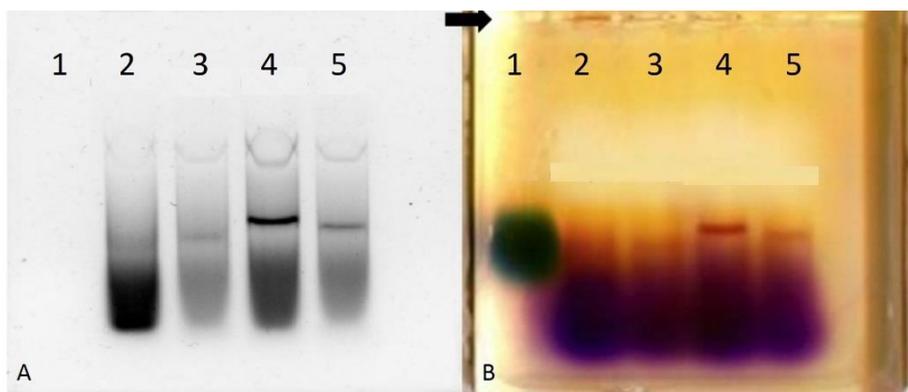


Figure 58 : Coloration au SYBR™ safe (A) puis au Stains-All (B) des extraits intracellulaires du clone 92sypG en milieu R. Témoin HE800 (1), extraits intracellulaires de la culture A (2), extraits intracellulaires de la culture B (3), extraits intracellulaires de la culture C (4), extraits intracellulaires de la culture D (5).

d) Traitements des extraits intracellulaires

Le contenu intracellulaire est très varié, ce qui rend l'interprétation de la coloration au Stains-All difficile. Différents traitements ont donc été envisagés, afin d'éliminer des éléments tels que l'ADN et les protéines, des échantillons, avant d'effectuer la coloration (Tableau XXIV). Cette expérience a été menée sur les extraits intracellulaires des cultures B (milieu R, acide glucuronique 0,770 mM + (N-Acétyleglucosamine + N-Acétylegalactosamine) 0,380 mM)et D (fructose 0, 770 mM).

Tableau XXIV : Récapitulatif des traitements effectués sur 50 µL de chaque échantillon.

Traitement	étapes
1	0,5 µL de RNase A (Thermo scientific), 37°C pendant 30 minutes.
2	1 µL de protéinase K (Novagen), 50°C pendant 2 heures.
3	1 µL de DNase I (ambion) + 5 µL de tampon 10X, 37°C pendant 30 minutes.
4	traitements 1 et 3 en même temps, puis traitement 2.

Après traitement, les échantillons ont été déposés dans un gel de polyacrylamide. Les échantillons ayant subi le traitement 1 étaient difficiles à déposer (ressortaient des puits), ils ont été exposés à l'air afin d'évaporer d'éventuelles traces d'alcool (aucun changement). Les échantillons ayant subi le traitement 1 n'ont donc pas pu être analysés. Après les traitements 2 et 3, des acides nucléiques sont encore présents (Figure 59 A). Les traces obtenues par coloration au Stains-All (Figure 59 B) sont superposables à celles obtenues avec la coloration au SYBR™ safe (Figure 59 A). Aucun EPS n'a donc été mis en évidence dans les extraits intracellulaires des cultures B et D du clone 92sypG.

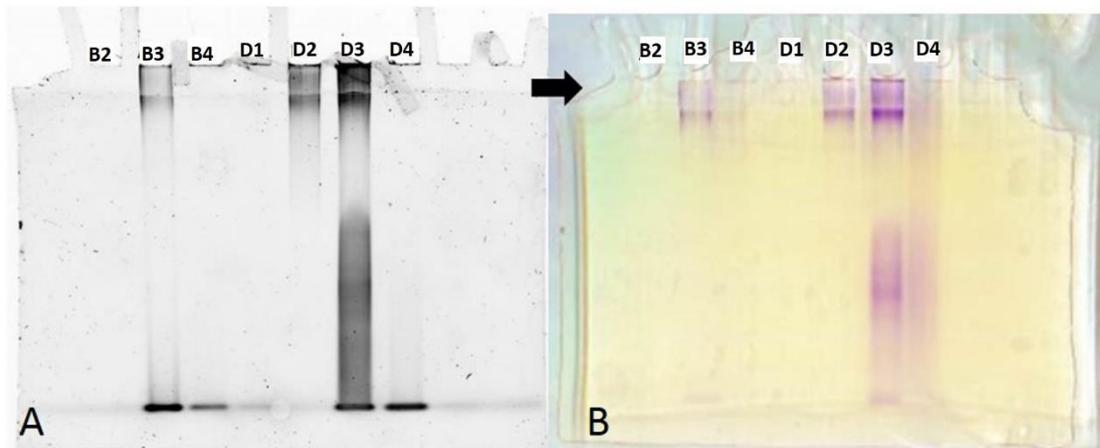


Figure 59 : Coloration au SYBR™ safe (A) puis au Stains-All (B) des extraits intracellulaires des cultures B et D du clone 92sypG en milieu R, soumis à différents traitements. Extraits intracellulaires de la culture B soumis au traitement 2 (B2), extraits intracellulaires de la culture B soumis au traitement 3 (B3), extraits intracellulaires de la culture B soumis au traitement 4 (B4), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 1 (D1), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 2 (D2), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 3 (D3), extraits intracellulaires de la culture D soumis au traitement 4 (D4).

III. Conclusion

Le cluster de l'EPS HE800 a été cloné chez *E. coli*, afin d'obtenir un hôte recombinant qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse de l'EPS HE800. Malgré différentes techniques de complémentation des milieux et de variation des conditions de culture, la production, même partielle, de l'EPS HE800 n'a pas été mise en évidence chez les souches recombinantes obtenues, que ce soit dans le milieu intra ou extracellulaire. La croissance et la viabilité des souches recombinantes ne semblent pas affectées par la présence du cluster. Cette non-production pourrait être due à une trop faible synthèse des sucres précurseurs de l'EPS HE800 chez la souche hôte, il est également possible que le cluster ne soit pas exprimé de la bonne manière chez *E. coli*.

Une comparaison des niveaux de transcription des gènes du cluster entre *V. diabolicus* et la souche recombinante, ont permis de mettre en évidence un défaut de la production du régulateur SypG chez cette dernière. Des séquences pouvant permettre la fixation de cette protéine ont été identifiées *in silico* sur le cluster HE800.

L'expression constitutive de *sypG* a été établie chez la souche recombinante, mais n'a pas permis la production d'EPS HE800. L'induction du cluster qui en résulte semble versatile, en fonction du niveau de transcription de ce gène, et d'autres facteurs inconnus impliqués. La régulation du cluster HE800 chez *V. diabolicus* est probablement liée à différents facteurs, absents chez la souche recombinante.

Chapitre 4 : Stratégies autour du cluster HE800.

Différentes stratégies ont été mises en place au cours de ce travail de thèse, afin d'approfondir la connaissance des mécanismes de biosynthèse de l'EPS HE800. Toutes n'ont pas pu être complètement explorées.

I. Etude de la disponibilité en précurseurs sucres chez la souche recombinante

La production d'HE800 n'a pas été détectée jusqu'à présent dans les extraits intracellulaires ou extracellulaires de la souche recombinante. Ceci pourrait être lié au fait que la production d'acide glucuronique, de *N*-Acétylglucosamine et de *N*-Acétylgalactosamine, pourrait être insuffisante chez *E. coli* pour permettre la synthèse de l'EPS HE800.

L'augmentation de la disponibilité des sucres précurseurs peut s'effectuer à la fois par des méthodes physiologiques comme par exemple, les tests de production en milieu R dans le chapitre 3, mais également par la modification, grâce à l'ingénierie génétique, des voies métaboliques responsables de la synthèse des précurseurs d'intérêt.

Une étude bibliographique préalable a été effectuée concernant l'ingénierie génétique réalisée pour l'optimisation de la production de l'acide hyaluronique (Chen et al., 2009; Liu et al., 2011; Mao et al., 2009; Prasad et al., 2010), et de l'héparosane (Roman et al., 2003; C. Y. Zhang et al., 2012). D'après ces modèles, la duplication (clonage) d'un ou plusieurs gènes impliqué(s) dans les voies métaboliques d'intérêt (à l'origine des précurseurs sucres requis) semble plus efficace sur la production de l'EPS recherché, que leur surexpression (promoteur inductible).

Les voies métaboliques responsables de la synthèse des nucléotides sucres précurseurs de la synthèse de l'EPS HE800 chez *E. coli* ont été étudiées. Parmi les gènes impliqués dans ces voies, des candidats à la duplication de gène ont été sélectionnés. Ces gènes ont également été recherchés chez *V. diabolicus* par homologie. L'objectif était d'évaluer et de comparer les taux d'activité de ces enzymes et leurs niveaux d'expression entre *V. diabolicus* et la souche *E. coli* recombinante (dosages enzymatiques et RT-qPCR).

Le site « The SEED » répertorie différentes informations sur des génomes disponibles, notamment concernant certains réseaux métaboliques. L'exploitation de ces données a permis de reconstituer visuellement les voies métaboliques à l'origine des précurseurs de l'EPS HE800 chez *E. coli* DH10B, la souche hôte (Figure 60).

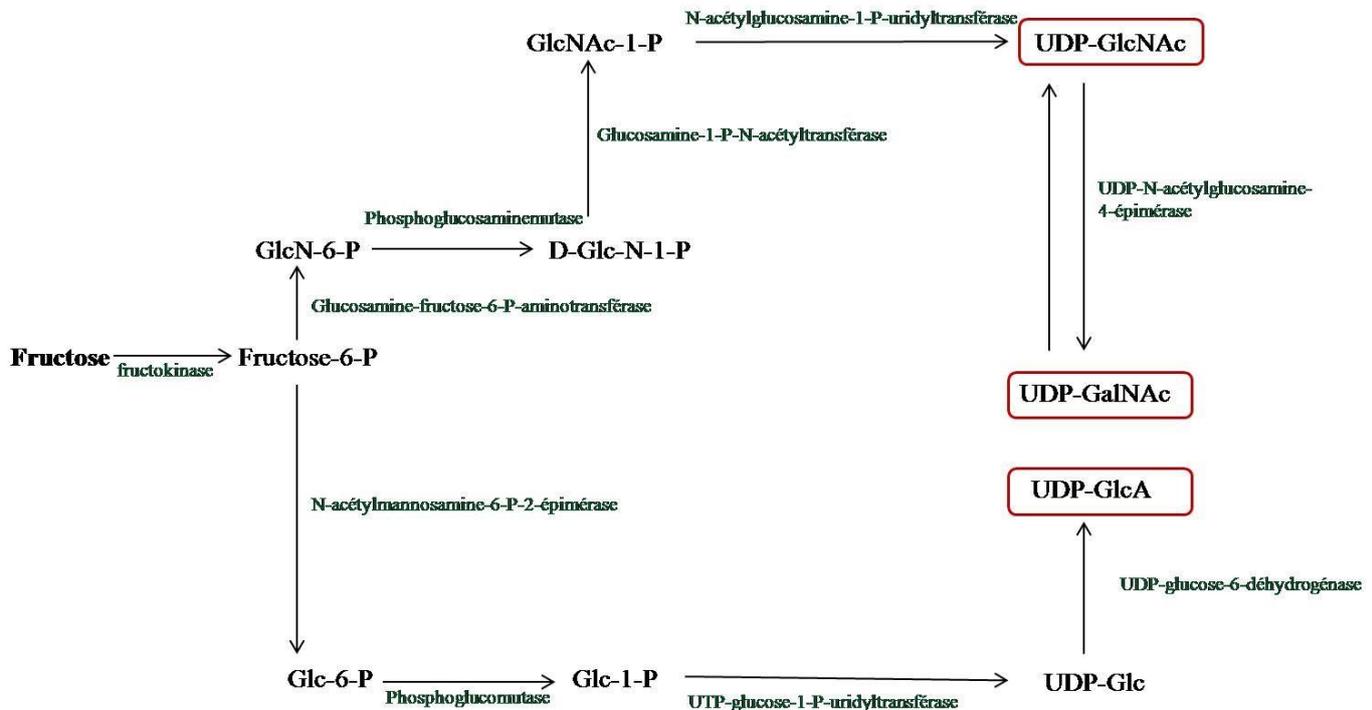


Figure 60 : Voies de biosynthèse des précurseurs de l'EPS HE800 chez *E. coli* DH10B (source The SEED Viewer).

Dans un premier temps, trois enzymes ont été sélectionnées pour leurs effets potentiels sur la synthèse des précurseurs osidiques souhaités (Figure 61) :

- L'enzyme bifonctionnelle *N*-acétylglucosamine-1-phosphate uridylyltransférase (EC 2.7.7.23) / glucosamine-1-phosphate *N*-acétyltransférase (EC 2.3.1.157).
- L'UDP-glucose -6-déshydrogénase (EC 1.1.1.22).
- L'UDP-*N*-acétylglucosamine 4-épipimérase (EC 5.1.3.7).

Le gène codant pour la NAD-dépendante glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) a été retenu comme gène de référence potentiel pour la normalisation des résultats en RT-qPCR.

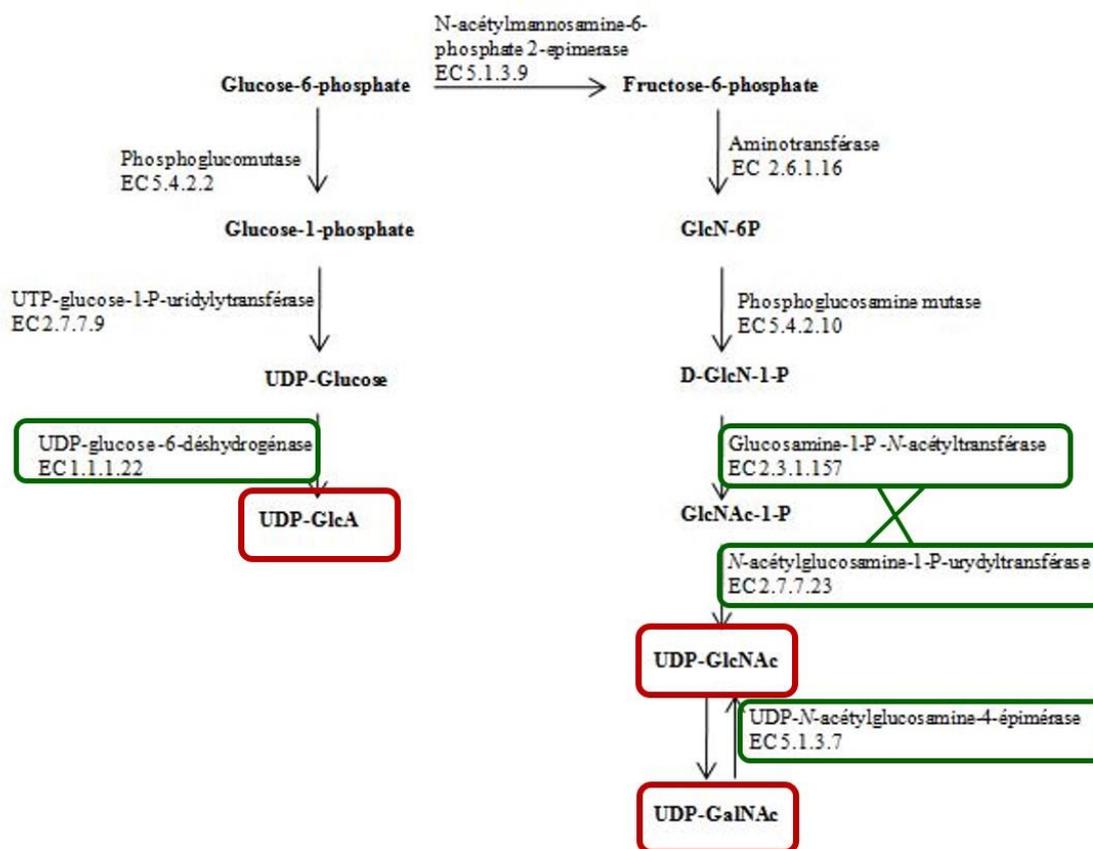


Figure 61 : Sélection des enzymes impliquées dans la formation des précurseurs de l'EPS HE800 chez *E. coli* DH10B. Les noms des enzymes sélectionnés sont entourés en vert.

Les gènes correspondant aux enzymes sélectionnés chez *E. coli* DH10B (Figure 61) ont également été recherchés chez *V. diabolicus* par homologie.

A partir de ces séquences, des amorces utilisables en RT-qPCR ont été dessinées pour chaque gène des deux espèces (Tableau IV). La fonctionnalité et la spécificité des amorces obtenues a été validée par PCR sur l'ADN génomique de *V. diabolicus* et *E. coli* DH10B.

Un prélèvement de 1 mL a été effectué sur une culture de *V. diabolicus* en condition productrice pour l'EPS HE800 (milieu Zobell supplémenté en glucose 30 g/L) au bout de 3 heures, 6 heures et 9 heures de culture.

Les niveaux de transcription des gènes sélectionnés, normalisés par le niveau de transcription de la GAPDH, ont alors été calculés (Figure 62).

En ce qui concerne l'enzyme bifonctionnelle *N*-acétylglucosamine-1-phosphate uridylyltransférase/glucosamine-1-phosphate *N*-acétyltransférase, le niveau observé de transcription du gène correspondant est très faible au bout de 3 heures de culture, et élevé au

bout de 9 heures. En revanche c'est le contraire pour les gènes codant l'UDP-glucose -6-déshydrogénase et l'UDP-N-acétylglucosamine 4-épipérase (Figure 62).

A la seule considération de ce graphique, il pourrait être supposé que *V. diabolicus* aurait tendance à rendre plus disponibles l'acide glucuronique et la N-Acétylgalactosamine au cours des 3 premières heures de culture, cette disponibilité diminuerait ensuite au profit de celle de la N-Acétylglucosamine.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de le refaire, en incluant une étude chez *E.coli*, et mener en parallèle une cinétique sur la synthèse d'EPS HE800 chez *V. diabolicus*, ainsi qu'une mesure de la disponibilité des précurseurs sucres pour *E. coli* et *V. diabolicus*, comme réalisé par Restaino *et al.* (Restaino *et al.*, 2017) chez *E. coli*, afin de vérifier leur adéquation avec les niveaux de transcription relevés.

Il serait également intéressant de comparer les niveaux de transcription de ces gènes chez *V. diabolicus* en condition apport de glucose et sans glucose, afin de confirmer les résultats de transcriptomique précédemment obtenus (Tableau X).

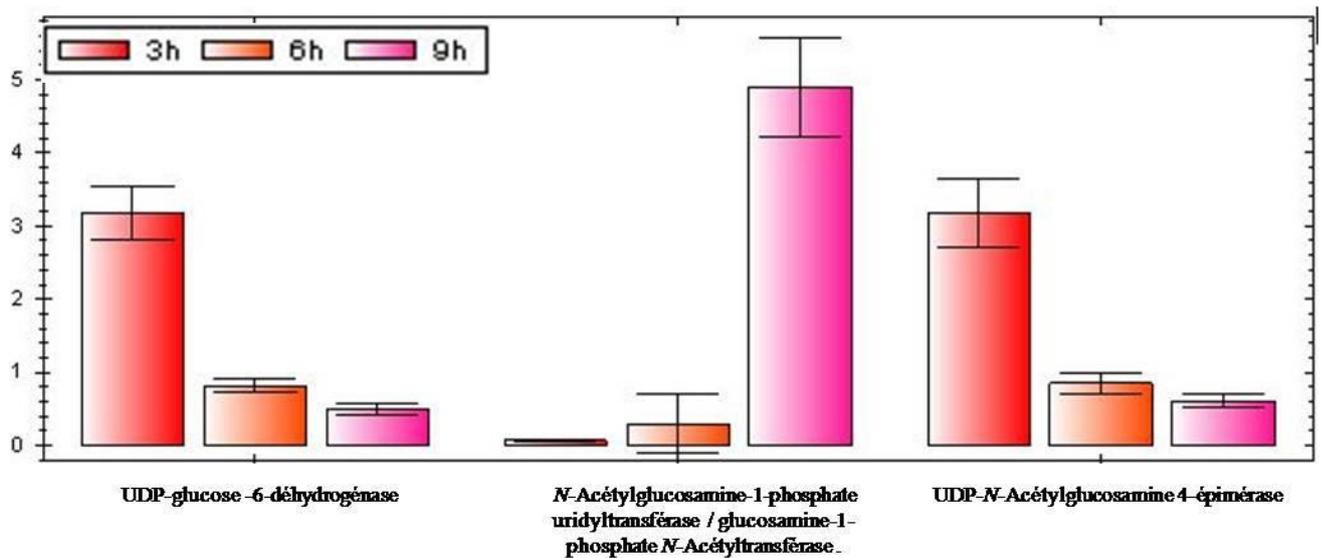


Figure 62 : Etude transcriptionnelle des gènes impliqués dans la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800 chez *V. diabolicus* au bout de 3, 6 et 9 heures de culture en présence de glucose.

Cette étude (chapitre 4, I) a été envisagée pour comparer la disponibilité des précurseurs d'intérêt, et les niveaux de transcription des gènes correspondants, chez *V. diabolicus* et chez la souche hôte.

En fonction des résultats, les voies de biosynthèse des précurseurs de l'EPS HE800 auraient été modifiées chez la souche hôte. Une copie des gènes codant les enzymes nécessaires à la synthèse des précurseurs dont la disponibilité aurait été jugée insuffisante, et aurait alors été ajoutée à la souche hôte. Cette technique devait permettre d'optimiser la production d'EPS, ou de l'établir à partir de sucres comme le glucose.

Le séquençage de la première souche recombinante utilisée au commencement de cette thèse, a révélé la présence d'un insert sans lien avec le cluster HE800. Cette expérience a donc été laissée en attente, le temps de construire une souche recombinante, avec le cluster HE800, et d'effectuer les tests de production nécessaires.

II. Assemblage du cluster dans la levure

Afin de construire la souche *E. coli* recombinante portant le cluster de l'EPS HE800, une première banque fosmidique d'ADN génomique a été réalisée. Cette première expérience a été un échec. Afin d'optimiser les chances de succès d'obtenir une production recombinante, en parallèle d'une seconde banque, un assemblage du cluster de l'EPS HE800 par recombinaison homologue dans la levure, a été envisagé.

Cette technique repose sur les facultés de réparation de l'ADN de la levure. Si des fragments d'ADN, dont les séquences des extrémités se superposent, sont introduits dans la levure, celle-ci va les assembler en un fragment unique.

Cette technique a déjà été utilisée avec succès pour cloner simultanément une voie d'utilisation du xylose et une voie de biosynthèse de zéaxanthine, soit un assemblage d'environ 20 Kb (Shao, Zhao, & Zhao, 2009).

Le vecteur navette pRS416, compatible avec *Saccharomyces cerevisiae* et *E. coli* a été choisi pour accueillir l'assemblage du cluster. Des amorces chevauchantes (Tableau IV) ont été dessinées d'après la séquence du cluster de l'EPS HE800 (Figure 63). La zone de chevauchement des fragments était d'au moins 200 pb, afin d'optimiser la recombinaison (Shao Zhao, & Zhao, 2009).

Comme la seconde banque d'ADN génomique a permis d'obtenir cinq souches recombinantes, cette expérience a été abandonnée. Les amorces (Tableau IV) ont néanmoins été utilisées pour le séquençage des clusters des souches recombinantes (Chapitre III, II, C).

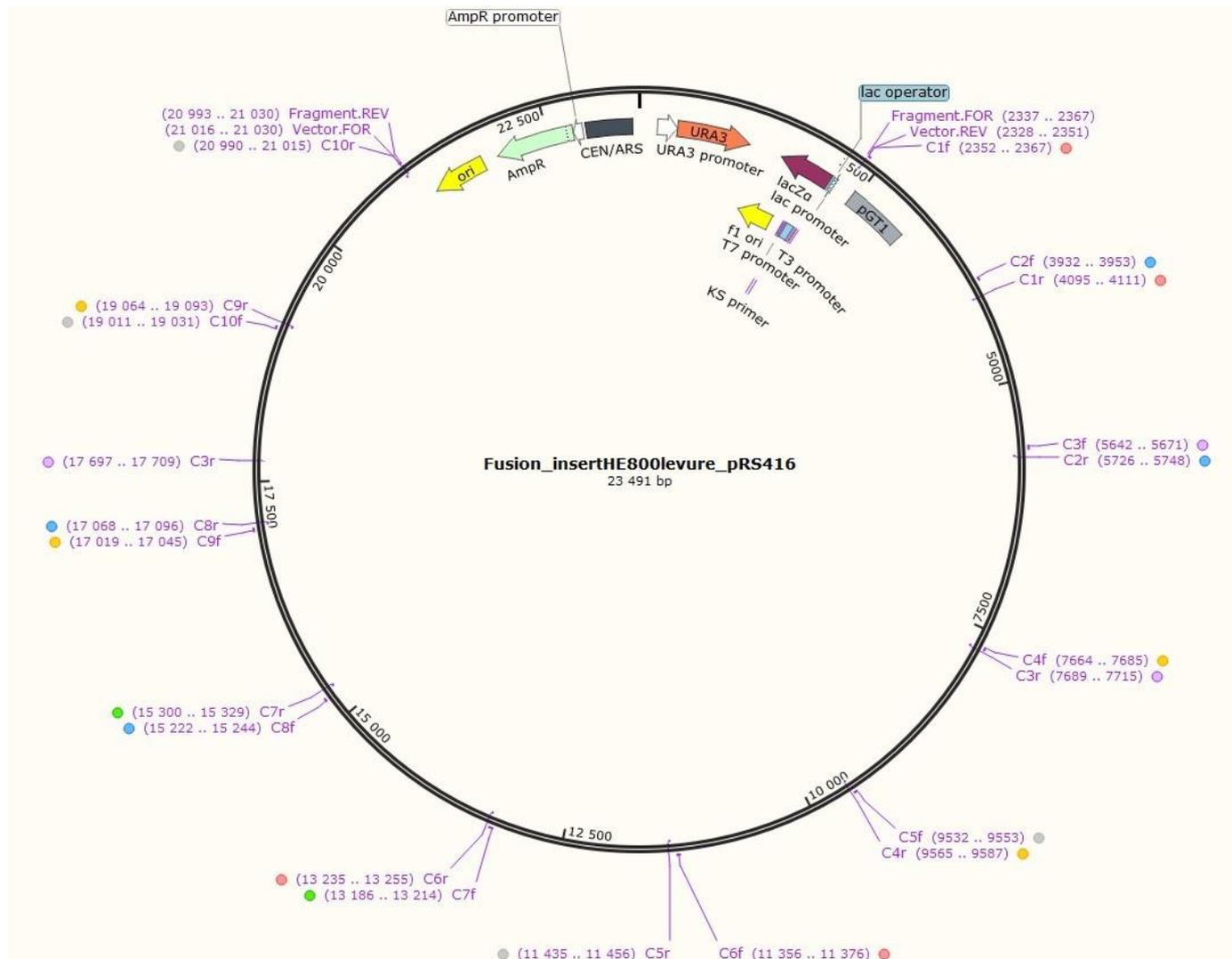


Figure 63 : Assemblage du cluster HE800 dans le vecteur navette pRS416.

III. Souches recombinantes portant une partie du cluster

Le cluster de l'EPS HE800 comporte 6 glycosyltransférases, pourtant, 3 seulement seraient absolument nécessaires à la synthèse de l'EPS HE800 (Goudenege et al., 2014). Des constructions génétiques, comportant une sélection de gènes du cluster HE800, ont été envisagées, afin d'obtenir une production recombinante.

A. Clonage différentiel du cluster HE800

Cette partie a été réalisée par l'encadrement de deux stagiaires (2^e année BTS et master 1).

Différents fragments, comprenant toujours *sypR* et d'une taille croissante (Figure 64), du cluster HE800 ont été amplifiés et clonés dans le vecteur d'expression pET SUMO (Tableau III et IV).

Cette expérience devait permettre de vérifier la production des protéines du cluster chez *E. coli*, et également de réaliser un test de production de l'EPS HE800 en milieu R supplémenté avec les précurseurs de l'EPS HE800, et du lactose pour induire la production des protéines (promoteurs de type T7 sur le vecteur pET SUMO).

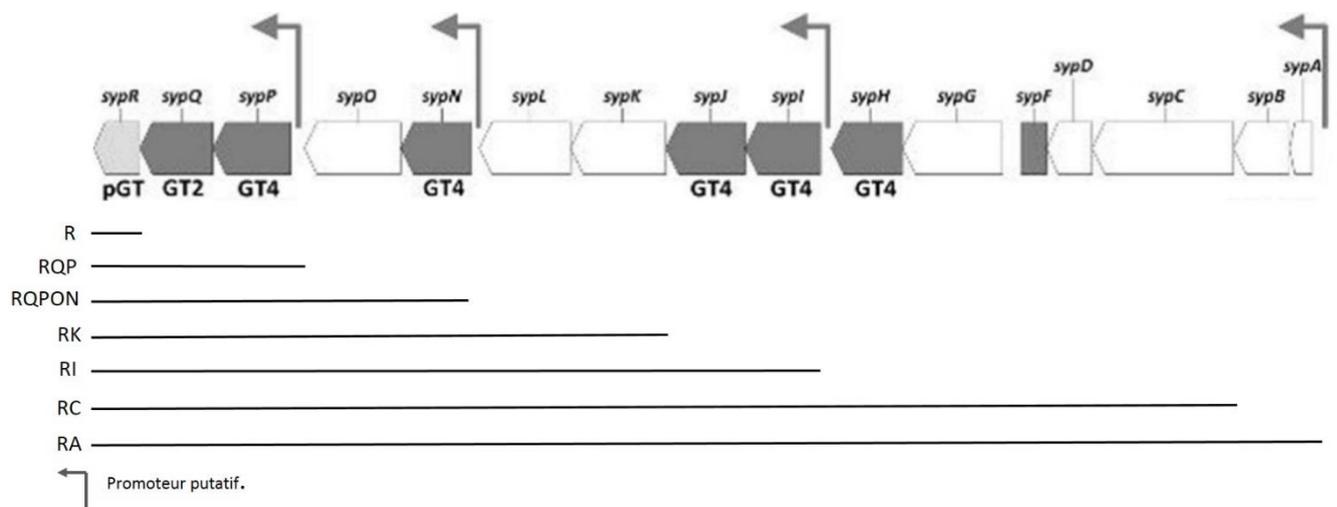


Figure 64 : Schéma des fragments choisis pour le clonage différentiel du cluster HE800. Les promoteurs potentiels ont été placés par homologie avec le cluster *syp* (E. S. Yip et al., 2005).

Les clones recombinants contenant les quatre premiers fragments ont été obtenus. La visualisation des protéines sur gel SDS page s'est révélée délicate, des bandes parasites étant présentes, notamment à l'emplacement attendu des protéines. Il serait intéressant de poursuivre le clonage des fragments (jusqu'à cloner le cluster entier), et optimiser les milieux de culture pour visualiser les protéines.

B. Réassemblage partiel du cluster HE800.

Cette partie a été réalisée par l'encadrement d'un stagiaire de 2^e année de BTS.

Les clones recombinants 2, 49, 59, 78 et 92 (Chapitre 3)(Tableau II) portent le cluster de l'EPS HE800 sur un fosmide, ce vecteur permet l'expression des promoteurs inclus dans le fragment cloné (Tableau III).

D'autres vecteurs permettent de réassembler des voies de biosynthèse en s'affranchissant des promoteurs d'origine (He et al., 2015; Xu, Vansiri, Bhan, & Koffas, 2012).

Le réassemblage partiel du cluster de l'EPS HE800 a donc été envisagé, afin de s'affranchir de ses promoteurs d'origine, et vérifier si un nombre réduit de gènes ne suffiraient pas à la production, même partielle, de l'EPS HE800 (Goudenege et al., 2014). Les gènes considérés comme strictement nécessaires à la synthèse de l'EPS HE800 ont été préalablement sélectionnés, en laissant de côté dans un premier temps les gènes impliqués dans la modulation du polymère (longueur de chaîne). Les gènes retenus étaient *sypR*, *sypQ* et *sypP*, pour leur implication dans l'initiation de la polymérisation et l'assemblage de l'unité répétitive, et *sypL*, *sypK* et *sypC* impliqués dans la polymérisation et l'export de l'EPS (Goudenege et al., 2014). Le choix du vecteur s'est porté sur le pETM6 (Xu et al., 2012). Ce plasmide a été dessiné pour l'ingénierie métabolique chez *E. coli*. Il comporte différents sites de restriction répartis de telle manière, qu'après avoir cloné indépendamment chaque gène sélectionné dans le pETM6, il soit possible de tous les assembler selon trois conformations différentes, opéron, pseudo-opéron ou forme monocistronique.

Dans le cas de l'opéron, les gènes sont transcrits ensemble, ils sont placés devant un promoteur unique et derrière un unique terminateur. Dans le cas du pseudo-opéron, chaque gène est placé devant un promoteur, mais tous les gènes assemblés dépendent du même terminateur, ainsi, plus un gène sera proche de ce dernier, plus il sera transcrit. Dans le cas de la forme monocistronique, chaque gène est placé devant un promoteur et derrière un terminateur.

Le vecteur pETM6 a été notamment utilisé pour l'assemblage d'une voie de biosynthèse de flavonoïdes (7 gènes), ainsi que les gènes *kfoA*, *kfoC* et *kfoF* d'*E. coli* K4 pour la production de chondroïtine, chez *E. coli* BI21 (DE3). Dans les deux cas, l'assemblage des gènes sélectionnés en conformation pseudo-opéron a permis d'obtenir un meilleur rendement de flavonoïdes et de chondroïtine que la conformation monocistronique ; la conformation opéron donnait le rendement le plus faible (He et al., 2015; Xu et al., 2012).

La séquence du gène *sypP* comporte un site de restriction incompatible avec le pETM6 (gène coupé), son clonage dans le pCDM4 (Xu et al., 2012), un vecteur similaire au pETM6, mais portant des sites de restriction et une résistance à un antibiotique différents, a été envisagé, afin

d'être transformé dans une bactérie portant déjà une construction, avec les autres gènes sélectionnés, dans le pETM6.

L'assemblage des gènes sélectionnés a été réalisé préalablement *in silico*, dans l'ordre où ils sont placés naturellement sur le cluster, avec *sypR* placé au plus près du terminateur, et *sypP* cloné seul dans le pCDM4 (Figure 65).

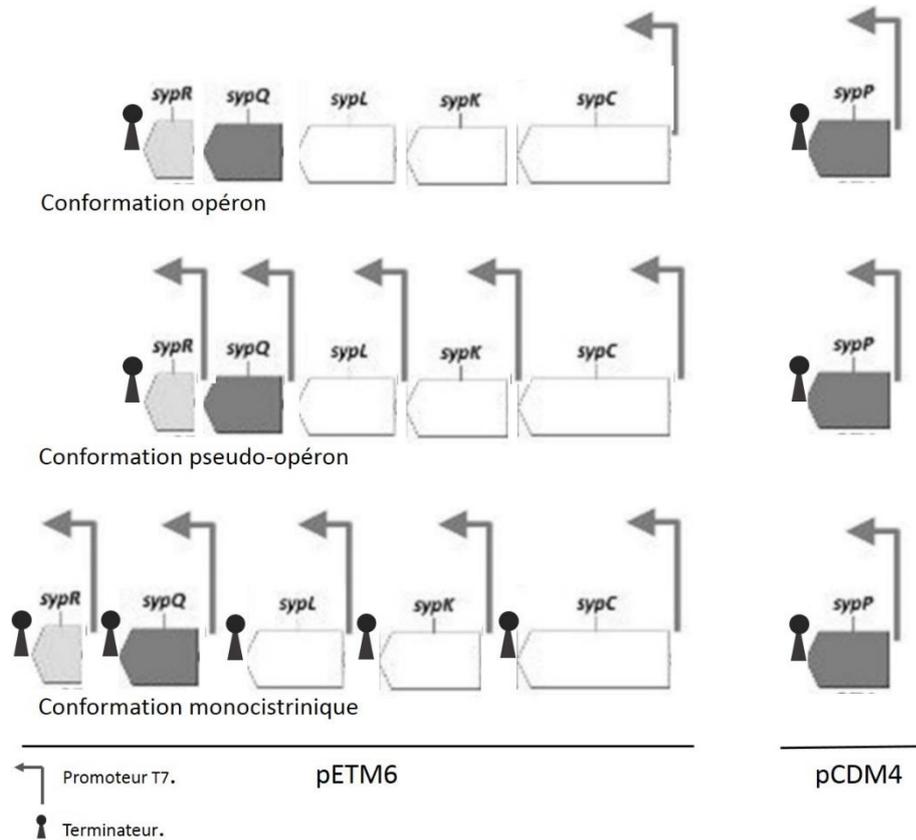


Figure 65 : Réassemblages partiels envisagés du cluster HE800.

Des amorces comportant les sites de restriction compatibles ont été dessinées pour chaque gène (Tableau IV). Jusqu'à présent, chaque gène a été cloné indépendamment dans le pETM6, à l'exception de *sypP* qui a été cloné dans le pCDM4 (Tableaux II et III).

Il serait intéressant de poursuivre ce projet, en commençant par le réassemblage des gènes sélectionnés en conformation pseudo-opéron, celui-ci ayant démontré le plus d'efficacité par rapport aux conformations opéron et monocistronique dans deux réassemblages différents (He et al., 2015; Xu et al., 2012). Le mutant obtenu serait alors soumis à un test de production en milieu R supplémenté avec les sucres composant l'EPS HE800, et du lactose pour induire les promoteurs T7 des vecteurs pETM6 et pCDM4.

Conclusion générale et perspectives

Les travaux décrits dans ce mémoire avaient pour objectif de mieux comprendre le mécanisme de biosynthèse de l'HE800, polysaccharide GAG mimétique produit par *V. diabolicus*, afin d'augmenter ses rendements de production et si possible modifier sa structure. Différentes approches ont été envisagées. Plusieurs ont donné des résultats décevants, mais ont permis d'identifier de nombreux verrous métaboliques ou régulateurs soit chez *V. diabolicus*, soit chez les bactéries recombinantes. Ce travail ouvre donc de nombreuses perspectives.

La présence de clusters similaires au cluster HE800, les clusters *eps*, a été recherchée au sein de 103 génomes représentatifs des Vibrionaceae. Ce cluster s'est révélé présent chez 70% des génomes analysés, parmi les genres *Vibrio*, *Aliivibrio*, *Photobacterium* et *Enterovibrio*. Les clusters *eps* sont globalement bien conservés, en particulier au niveau de la synténie. Un cluster *eps* d'origine, pourrait avoir été transmis par un ancêtre commun au cours de la spéciation.

Les clusters *eps* découverts chez les Vibrionaceae, pourraient permettre la synthèse d'EPS de structures différentes, en raison de leurs variations. D'autres études seraient nécessaires afin de collecter et caractériser les EPS produits. La caractérisation d'un grand nombre d'EPS, en relation avec la structure de leurs clusters génétiques, permettrait d'approfondir la connaissance des mécanismes de biosynthèse de ce type d'EPS. Les résultats obtenus pourraient également avoir des applications en biologie de synthèse, afin de produire des EPS dotés de modifications structurales souhaitées.

Dans un premier temps, il serait intéressant de tester des souches présentant un cluster avec une structure identique à celui du HE800, comme *V. alginolyticus*, *V. azureus* ou *V. campbelli*. Si ces espèces produisent un EPS similaire au HE800, il serait ensuite intéressant de déterminer laquelle produit le plus. Plusieurs souches pourraient aussi être étudiées dans chaque espèce.

La comparaison des transcriptomes de *V. diabolicus* en condition inductrice et non inductrice pour la production de l'EPS HE800 montre que la présence de glucose induit, après 10h de culture, un ensemble de 102 gènes et réprime l'expression de 92 gènes, majoritairement associés au transport de nutriments à la production d'énergie et à la construction cellulaire. Selon cette étude transcriptomique, le glucose ne semble pas induire l'expression des gènes responsables de la synthèse des précurseurs de l'EPS HE800, ni du cluster de gènes associé à la synthèse de l'HE800, à l'exception de *sypR*, qui code pour l'enzyme initiateur. Cependant, les résultats obtenus par rt-qPCR suggèrent que *V. diabolicus*, en condition productrice (ajout de glucose), aurait tendance à rendre plus disponibles l'acide glucuronique et la *N*-Acétylgalactosamine au cours des 3 premières heures de culture, cette disponibilité diminuerait

ensuite au profit de celle de la *N*-Acétylglucosamine. Une nouvelle analyse par rt-qPCR de ces gènes et des gènes du cluster HE800 chez *V. diabolicus*, en condition productrice et non productrice, au bout de 3, 6 et 10 heures de culture, permettrait de vérifier leur profil de transcription au cours de la synthèse d'EPS.

Chez *E. coli* K4, l'ajout de 0,385 mM d'acide glucuronique et d'*N*-Acétylgalactosamine, a permis d'augmenter la production de CPS K4 de 60 % chez *E. coli* K4, et a augmenté le niveau de transcription de *kfoC* (qui code la chondroïtine polymérase, une enzyme bifonctionnelle qui assemble le CPS K4) (Zanfardino et al., 2010) : son niveau d'expression est multiplié par 14 au bout de 24 heures de cultures. En revanche, l'ajout d'un seul de ces sucres ou de fructose à la concentration de 0,385 mM a révélé que l'acide glucuronique était celui qui induisait le plus haut niveau de transcription de *kfoC*, et le fructose celui qui induisait le plus faible. Cependant, l'ajout de fructose avait permis de produire davantage de CPS K4 que l'acide glucuronique. Un plus haut niveau de transcription de *kfoC* ne signifie donc pas automatiquement une plus grande quantité de CPS K4 produit. Inversement, une augmentation de la quantité d'EPS formé ne passe pas forcément par une surexpression des gènes directement associés à sa biosynthèse. Nos résultats suggèrent que l'expression du cluster HE800 est constitutive, ce qui est en accord avec le fait qu'en condition « non productrice », c'est-à-dire en l'absence de glucose, de l'EPS est tout de même détecté au bout de 24 heures de culture. Ce serait l'excédent de précurseurs disponibles, lorsque *V. diabolicus* se développe en présence de glucose qui permettrait l'intensification de la production. Des régulations similaires ont été décrites chez de nombreuses bactéries chez qui la phosphoglucomutase joue un rôle clé pour la balance entre production d'énergie et synthèse de précurseurs. L'affinité et l'activité spécifique des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse du polysaccharide et en particulier la priming glycosyltransférase constitueraient un second niveau de régulation (Yother, 2011).

Le cluster de l'EPS HE800 a été cloné chez *E. coli*, afin de produire des bactéries recombinantes plus faciles à manipuler pour mieux comprendre les mécanismes de biosynthèse de l'EPS HE800. Malgré les nombreux essais et constructions, les différentes techniques de complémentation des milieux et de variation des conditions de culture, la production, même partielle, de l'EPS HE800 n'a jamais été mise en évidence chez les souches recombinantes obtenues, que ce soit dans le milieu intra ou extracellulaire. La croissance et la viabilité des souches recombinantes ne semblent pas affectées par la présence du cluster, ce qui pourrait trahir son absence d'activité.

Une autre explication de cette absence de production du HE800 pourrait être que la synthèse d'acide glucuronique, de *N*-Acétylglucosamine et de *N*-Acétylgalactosamine, les sucres composant le HE800, est trop faible chez la souche recombinante, pour permettre la synthèse de l'EPS et les protéines codées dans le cluster pas suffisamment actives pour éviter la compétition avec la synthèse de polysaccharides pariétaux. De plus, l'enzyme UDP-glucose déshydrogénase, qui permet d'obtenir de l'UDP-acide glucuronique à partir d'UDP-glucose, est connue pour être faiblement active chez les *E. coli* non pathogènes (Mao et al., 2009), comme la souche hôte.

Selon Restaino (Restaino et al., 2013), *E. coli* K4 est capable de prélever directement dans le milieu de culture, l'acide glucuronique et la *N*-Acétylgalactosamine pour former le CPS K4. Ce travail a été suivi pour réaliser les tests de production chez les souches recombinantes, dans le cadre des cultures en présence des précurseurs fournis directement dans le milieu de culture. Cette étape réalisée, les voies de biosynthèse de ces précurseurs auraient alors été modifiées chez la souche productrice élue, afin d'accroître leur disponibilité pour la synthèse du HE800, à partir de substrats plus économiques, comme le glucose ou le fructose.

Les tests de production n'ayant pas fonctionné alors que le cluster semble intact, il convient de s'interroger sur la capacité de la cellule hôte à transporter les précurseurs. D'après l'annotation du génome d'*E. coli* K-12 DH10B, la souche hôte semble bien dotée des mêmes systèmes de transport qu'*E. coli* K4, pour la *N*-Acétylgalactosamine et l'acide glucuronique. Les gènes d'*E. coli* K-12 DH10B, *agaV* (ECDH10B_3306), *agaB* (ECDH10B_3311), *agaC* (ECDH10B_3312) et *agaD* (ECDH10B_3313), codent pour des systèmes PTS de transport de la *N*-Acétylgalactosamine. Le gène *exuT* (ECDH10B_3269) code pour le transporteur d'acide glucuronique (Nemoz, Robert-Baudouy & Stoeber, 1976). Pour le transport de la *N*-Acétylglucosamine, un système PTS de transport est codé par le gène *nagE* (ECDH10B_0744). La souche hôte semble donc bien équipée de gènes potentiellement impliqués dans le transport des sucres précurseurs. Cependant, il est possible que ces systèmes de transport ne soient pas fonctionnels. Il serait intéressant de procéder à une quantification des monosaccharides restants à différents temps de culture, afin de s'assurer qu'ils sont consommés.

Une fois les précurseurs entrés dans la cellule bactérienne, ils doivent être activés pour être assemblés par les glycosyltransférases (sous forme d'UDP-sucre). La *N*-Acétylgalactosamine et la *N*-Acétylglucosamine sont importées par un transporteur PTS, elles sont alors phosphorylées en *N*-Acétylgalactosamine-6-phosphate et *N*-Acétylglucosamine-6-phosphate. Ces produits sont ensuite respectivement pris en charge par la *N*-Acétylgalactosamine-6-

phosphate déacétylase et la *N*-Acétylglucosamine-6-phosphate déacétylase, et intègrent les voies de biosynthèse de l'UDP-*N*-Acétylglucosamine et de l'UDP-*N*-Acétylgalactosamine. En revanche, l'acide glucuronique n'est pas modifié au cours de son transport, il est phosphorylé intracellulairement par une glucuronokinase. Il est également possible que ces enzymes permettant la disponibilité intracellulaire des précurseurs prélevés dans le milieu, ne soient pas suffisamment actives chez la souche hôte.

Enfin, il a été montré chez *E. coli* K5, que la synthèse de polysaccharide était favorisée par la présence des précurseurs en proportions équilibrées (Roman et al., 2003; Wang, 2011). Il pourrait suffire qu'un seul précurseur du HE800 soit en défaut chez la souche recombinante, pour compromettre la synthèse d'EPS.

D'un autre côté, la comparaison des niveaux de transcription des gènes du cluster HE800 entre *Vibrio diabolicus* et la souche recombinante 92, en condition productrice, ont permis de mettre en évidence un défaut de la production du régulateur SypG chez cette dernière. Des séquences pouvant permettre la fixation de cette protéine ont été identifiées *in silico* sur le cluster HE800. L'expression constitutive de *sypG* a été établie chez la souche recombinante 92, mais n'a pas permis la production d'EPS HE800 en milieu supplémenté avec ses sucres précurseurs. L'induction du cluster HE800 qui en résulte chez la souche 92sypG semble versatile, en fonction du niveau de transcription de *sypG*. La régulation du cluster HE800 chez *V. diabolicus* est peut-être liée à différents facteurs de transcription, absents chez la souche recombinante.

L'analyse transcriptomique réalisée chez *V. diabolicus* en condition productrice et non productrice d'EPS HE800, n'a pas mis en évidence une différence du niveau de transcription de *sypG*, au bout de 10 heures de culture. Il serait intéressant de modifier la souche 92sypG avec les gènes *wbpP* codant l'épimérase de *Pseudomonas aeruginosa* et *kfiD* codant la déshydrogénase d'*E. coli* K5, et effectuer un nouveau test de production avec du glucose ou du fructose comme substrat. La présence de ces gènes pourrait permettre une meilleure disponibilité intracellulaire des précurseurs de l'EPS HE800, chez la souche 92sypG.

Afin de montrer que SypG se fixe bien sur les séquences identifiées *in silico* sur le cluster HE800, une expérience de gel-retard a été entreprise. Un mutant producteur de la protéine SypG a été réalisé. Ce projet devrait être poursuivi, avec les séquences fixatrices identifiées chez *V. fischeri* et sa protéine SypG comme témoin positif.

Parallèlement, il serait intéressant de tester la production du mutant de *V. diabolicus*, GV723. En effet chez *V. fischeri*, l'ajout d'un exemplaire de *sypG* chez la souche sauvage a permis

d'augmenter de 3,5 fois sa capacité à former un biofilm (Yip et al., 2005). Des tests préliminaires en erlenmeyer ont révélé que l'EPS HE800 produit par GV723 n'était pas différent de celui de *V. diabolicus*. A présent, il serait nécessaire de soumettre GV723 à une culture en fermenteur, afin de comparer son rendement en EPS HE800 à celui de *V. diabolicus*. En effet, il a été montré qu'un contrôle strict du pH et du taux d'oxygène au cours de la fermentation, comme généralement réalisé en fermenteur, pouvait permettre de doubler le rendement de CPS K4 chez *E. coli* K4, par rapport à une fermentation effectuée en erlenmeyer (Cimini et al., 2010; Restaino et al., 2013).

Pour finir, le choix d'un nouvel hôte recombinant pourrait être envisagé. En effet, la production recombinante d'autres glycosaminoglycanes-mimétiques a été réalisée avec succès chez des organismes tels que *B. subtilis*, et *L. lactis* (Prasad et al., 2010) (Widner et al., 2005) (Jin et al., 2016).

B. subtilis est couramment utilisé pour la production recombinante de molécules, notamment des protéines (Ozturk, Calik, & Ozdamar, 2016). Cet organisme reconnu comme sûr (GRAS), permet d'éviter la formation de produits toxiques au cours de la fermentation, comme les LPS (van Dijnl et Hecker, 2013; Harwood, 1992). *B. subtilis* est donc généralement préférée à *E. coli* pour la production de protéines recombinantes sécrétées, dénuée de membrane externe, elle dirige les protéines d'intérêt dans le milieu de culture (Sone, Nikoloff, & Zhang, 2015). Cette particularité permet de s'affranchir d'étapes de lyse cellulaire et de purifications pour collecter la protéine ciblée (Sone et al., 2015). De plus, *B. subtilis* constitue un outil génétique bien caractérisé, avec de nombreux vecteurs de clonage disponibles (Terpe, 2006). *L. lactis* présente également les propriétés évoquées pour *B. subtilis* (Song, In, Lim, & Rahim, 2017). Les levures, comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Pichia pastoris*, quant à elles, sont citées pour la production recombinante de protéines et de métabolites, de produits pharmaceutiques et de vaccins, mais pas de polysaccharides (Roohvand, Shokri, Abdollahpour-Alitappeh, & Ehsani, 2017).

Chez *B. subtilis* et *L. lactis*, le clonage des gènes *hasA* (acide hyaluronique synthase) de *S. zooepidemicus* et des gènes impliqués dans la disponibilité des précurseurs, permet d'établir la production recombinante d'acide hyaluronique (Prasad et al., 2010; Widner et al., 2005). Par ailleurs, récemment, la production recombinante d'héparosane et de chondroïtine a été établie chez *B. subtilis* (Jin et al., 2016). Le clonage du gène *PmHS1* de *Pasteurella multocida*, codant

pour l'héparosane synthase 1, ainsi que des gènes impliqués dans la disponibilité des précurseurs, permet d'établir la production recombinante d'héparosane chez *B. subtilis* (Chen et al., 2017).

La production recombinante d'EPS HE800 chez un hôte tel que *B. subtilis*, présenterait l'avantage de s'affranchir de la présence de LPS. Cependant, différents obstacles sont à considérer. Les assemblages, dans les souches recombinantes créés avec *B. subtilis* et *L. lactis*, des GAG-mimétiques acide hyaluronique, chondroïtine et héparosane, ont été réalisés grâce au clonage d'un seul gène pour chaque molécule, *hasA*, *kfoC* et *PmHS1*. Les gènes supplémentaires clonés dans ces constructions étaient impliqués dans la disponibilité des précurseurs, pas dans l'assemblage du polysaccharide. La biosynthèse de l'EPS HE800 semble nettement plus complexe. En effet, d'une part, une modification des voies de biosynthèse des précurseurs du HE800 doit être envisagée chez l'hôte, pour permettre leur disponibilité pour la production du HE800. D'autre part, l'initiation de la polymérisation de l'EPS HE800, son élongation, et enfin son export, reposent sur tout un ensemble de gènes. L'export des unités répétitives de l'EPS HE800, ainsi que leur fixation sur la chaîne de l'EPS, reposerait sur le mécanisme Wzx/Wzy dépendant, répandu chez les bactéries à Gram positif et négatif (Islam & Lam, 2014).

Il semble donc plus raisonnable, dans un avenir proche, de poursuivre le travail décrit dans ce mémoire. Les reconstructions partielles du cluster HE800 entreprises chez *E. coli* devraient être finalisées (conf chapitre 4), elles permettraient de s'affranchir des régulations liées aux promoteurs d'origine de *V. diabolicus* (SypG par exemple). De plus, ces constructions permettraient peut-être d'obtenir une production, même partielle, de HE800, avec un nombre de gènes du cluster HE800 réduit. Cette étape réalisée faciliterait l'essai d'une production recombinante chez *B. subtilis*.

Des modifications de *V. diabolicus* ou de ses milieux et modes de culture pourraient aussi être envisagées, afin de tester leurs impacts sur sa production d'EPS HE800.

Des études physiologiques ont été menées pour améliorer la production de polysaccharides capsulaires K5. D'après une comparaison de différentes sources de carbone, une plus grande quantité d'héparosane est obtenue à partir de glycérol (187 mg/L), plutôt qu'avec du glucose (148 mg/L) (Liu et al., 2012). Ce substrat pourrait être testé chez *V. diabolicus*, afin de vérifier si un effet similaire est observé.

Chez *B. subtilis*, le clonage d'un troisième gène, en plus de *hasA* et *tauD*, le gène *VHb* (*Vitreoscilla* hemoglobine), qui permet de reconstituer une partie de l'énergie consommée par la synthèse de l'acide hyaluronique, permet d'obtenir 1,8 g/L d'acide hyaluronique (Chien & Lee, 2007). En effet, la biosynthèse d'acide hyaluronique présente un coût énergétique important pour la cellule : pour la formation d'une mole d'acide hyaluronique, 3 moles d'ATP et 2 moles d'UTP sont nécessaires (Widner et al., 2005). Or, il a été montré chez *E. coli* cultivée dans un milieu limité en oxygène, que la présence de *VHb* permettait d'augmenter la production d'ATP au sein de la cellule (Kallio et al., 1994). Cette propriété utilisée pour augmenter la quantité d'ATP disponible pour la synthèse de l'acide hyaluronique, pourrait être expérimentée chez *V. diabolicus*.

Les travaux décrits jusqu'à présent concernant la production recombinante de GAG-mimétiques montrent qu'aucune souche recombinante n'a produit plus que l'organisme d'origine. L'objectif de ce type de production n'est donc pas quantitatif, mais qualitatif, il permet de s'affranchir de molécules indésirables comme les LPS, ou influencer sur un paramètre aussi important pour les propriétés des EPS, que leur masse moléculaire. L'utilisation d'une souche recombinante dont les métabolismes sont très bien connus, constitue un formidable outil génétique, afin d'apporter une connaissance fondamentale des mécanismes de biosynthèse des EPS, potentialisable à des fins appliquées.

Productions scientifiques

Publications

- Lou Lebellenger, Véronique Verrez-Bagnis, Delphine Passerini, Christine DelbarreLadrat. *Comparative genomics reveals a widespread distribution of an exopolysaccharide biosynthetic gene cluster among Vibrionaceae*. BMC Research Notes.
- Christine Delbarre-Ladrat, Corinne Siquin, Lou Lebellenger, Agata Zykwinska, Sylvia Collic-Jouault. *Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules*. Frontiers in Chemistry, 2014. 2.

Communications orales

- Colloque 10 - Exo-polysaccharides marins et biotechnologie bleue (EXOBIO), dans le cadre des journées scientifiques de l'université de Nantes, 10 juin 2016. « *Heterologous production of HE800, an exopolysaccharide of interest for health* ». L. Lebellenger, V. Verrez-Bagnis, C. Siquin, A. Zykwinska, S. Collic-Jouault, M. Dols-Lafargue, C. Delbarre-Ladrat.
- 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 10-13 mai 2015, Espoo, Finlande. « *Marine-derived bacterial polysaccharides are valuable sources of glycosaminoglycans* ». L. Lebellenger, J. Ratiskol, C. Siquin, A. Zykwinska, S. Collic-Jouault, C. Delbarre-Ladrat.

Posters

- 11th Carbohydrate Bioengineering Meeting, 10-13 mai 2015, Espoo, Finlande. « *Recombinant production of an exopolysaccharide of interest for health industry* ». L. Lebellenger, J. Ratiskol, C. Siquin, A. Zykwinska, S. Collic-Jouault, M. DolsLafargue, C. Delbarre-Ladrat
- 6th Edition Polymerix, 28-29 mai 2015, Rennes. « *Recombinant production of an exopolysaccharide of interest for health industry* ». L. Lebellenger, J. Ratiskol, C. Siquin, A. Zykwinska, S. Collic-Jouault, M. DolsLafargue, C. Delbarre-Ladrat
- Les 25^e journées du Groupe Français des Glycosciences, 12-15 mai 2014, Paris. « *Etude de la biosynthèse de l'exopolysaccharide bactérien HE800 de Vibrio diabolicus, mise en place de*

sa production recombinante chez E. coli ». Lebellenger.L, Ratiskol.J, Zykwinska.A, Siquin.C, Collic-Jouault.S, Dols-Lafargue.M, Delbarre-Ladrat. C

Enseignement.

Tp de biologie animale en L1 (48h sur les semestres 1 et 2 année 2015/2016) à l'université de Nantes.

Références bibliographiques

- Al-Horani, R. A., & Desai, U. R. (2010). Chemical sulfation of small molecules-advances and challenges. *Tetrahedron*, 66(16), 2907-2918.
- Al-Nahas, M. O., Darwish, M. M., Ali, A. E., & Amin, M. A. (2011). Characterization of an exopolysaccharide-producing marine bacterium, isolate *Pseudoalteromonas sp* AM. *African Journal of Microbiology Research*, 5(22), 3823-3831.
- Allison, D. D., & Grande-Allen, K. J. (2006). Review. Hyaluronan: A powerful tissue engineering tool. *Tissue Engineering*, 12(8), 2131-2140.
- Amari, D. T., Marques, C. N. H., & Davies, D. G. (2013). The putative enoyl-coenzyme A hydratase Dspl is required for production of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion autoinducer cis-2-decenoic Acid. *Journal of Bacteriology*, 195(20), 4600-4610.
- Amiri-Jami, M., & Griffiths, M. W. (2010). Recombinant production of omega-3 fatty acids in *Escherichia coli* using a gene cluster isolated from *Shewanella baltica* MAC1. *Journal of Applied Microbiology*, 109(6), 1897-1905.
- Armstrong, D. C., Cooney, M. J., & Johns, M. R. (1997). Growth and amino acid requirements of hyaluronic-acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(3), 309-312.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith J.A., & Struhl, K. (2002). Short Protocols in Molecular Biology 5th Edition. Wiley.
- Ayabe-Chujo, Y., Usami, Y., Yoshida, T., Omori, T., & Nojiri, H. (2012). Membrane topology and functional analysis of *Methylobacillus sp* 12S genes epsF and epsG, encoding polysaccharide chain-length determining proteins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 76(3), 608-612.
- Badet, Bernard , Vermoote, Patricia , & Le Goffic, François (1988). Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: kinetic mechanism and inhibition by N3-fumaroyl-L-2,3-diaminopropionic derivatives. *Biochemistry*, 27(7), 2282-2287.
- 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.
- Balakrishnan, B., Lesieur, S., Labarre, D., & Jayakrishnan, A. (2005). Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture: a comparative study. *Carbohydrate Research*, 340(7), 1425-1429.
- Becker, A., Kuster, H., Niehaus, K., & Puhler, A. (1995). Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: Identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. *Molecular and General Genetics*, 249(5), 487-497.
- Belcher, C., Yaqub, R., Fawthrop, F., Bayliss, M., & Doherty, M. (1997). Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(5), 299-307.
- Berteau, O., & Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*, 13(6), 29R-40R.
- Bhaskar, U., Sterner, E., Hickey, A. M., Onishi, A., Zhang, F. M., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2012). Engineering of routes to heparin and related polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(1), 1-16.

- Black, P. N., & DiRusso, C. C. (2003). Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: Proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 454.
- Blank, L. M., Hugenholtz, P., & Nielsen, L. K. (2008). Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic streptococci. *Journal of Molecular Evolution*, 67(1), 13-22.
- Blank, L. M., McLaughlin, R. L., & Nielsen, L. K. (2005). Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(6), 685-693.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489.
- Boursicot, V. (2012). Etude de la biosynthèse de l'exopolysaccharide HE800 par la bactérie marine, *Vibrio diabolicus*. Thèse de l'Université de Nantes.
- Bramhachari, P. V., & Dubey, S. K. (2006). Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), 571-577.
- Bramhachari, P. V., Kishor, P. B. K., Ramadevi, R., Kumar, R., Rao, B. R., & Dubey, S. K. (2007). Isolation and characterization of mucous exopolysaccharide (EPS) produced by *Vibrio furnissii* strain VB0S3. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(1), 44-51.
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinform*, 10(1), 421.
- Carli, A., Pane, L., Casareto, L., Bertone, S., & Pruzzo, C. (1993). Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in the Tyrrhenian coast rock pools (Tyrrhenian sea, Italy) and its association with the copepod *Tigropius fulvus* (Fisher 1860). *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1960-1962.
- Chalkiadakis, E., Dufourcq, R., Schmitt, S., Brandily, C., Kervarec, N., Coatanea, D., . . . Simon-Colin, C. (2013). Partial characterization of an exopolysaccharide secreted by a marine bacterium, *Vibrio neocaledonicus* sp nov., from New Caledonia. *Journal of Applied Microbiology*, 114(6), 1702-1712.
- Chavez-Dozal, A., Hogan, D., Gorman, C., Quintanal-Villalonga, A., & Nishiguchi, M. K. (2012). Multiple *Vibrio fischeri* genes are involved in biofilm formation and host colonization. *Fems Microbiology Ecology*, 81(3), 562-573.
- Chen, J. H., Avci, F. Y., Munoz, E. M., McDowell, L. M., Chen, M., Pedersen, L. C., . . . Liu, J. (2005). Enzymatic redesigning of biologically active heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52), 42817-42825.
- Chen, S. J., Chen, J. L., Huang, W. C., & Chen, H. L. (2009). Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26(2), 428-432.
- Chen, W. Y., Marcellin, E., Hung, J., & Nielsen, L. K. (2009). Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18007-18014.
- Chen, X. F., Chen, R., Yu, X. X., Tang, D. Y., Yao, W. B., & Gao, X. D. (2017). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for biosynthesis of heparosan using heparosan synthase from *Pasteurella multocida*, PmHS1. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(5), 675-681.
- Chien, L. J., & Lee, C. K. (2007). Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress*, 23(5), 1017-1022.
- Chien, Liang-Jung, & Lee, Cheng-Kang. (2007). Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), 339-346.
- Choay, J., Petitou, M., Lormeau, J. C., Sinay, P., Casu, B., & Gatti, G. (1983). Structure activity relationship in heparin - a synthetic pentasaccharide with high-affinity for antithrombin-III and eliciting high anti-factor XA activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 116(2), 492-499.
- Chong, B. F., & Nielsen, L. K. (2003a). Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 153-162.

- Chong, B. F., & Nielsen, L. K. (2003b). Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnology*, *100*(1), 33-41.
- Chopin, N., Guillory, X., Weiss, P., Le Bideau, J., & Collicec-Jouault, S. (2014). Design polysaccharides of marine origin: chemical modifications to reach advanced versatile compounds. *Current Organic Chemistry*, *18*(7), 867-895.
- Cimini, D., Restaino, O. F., Catapano, A., De Rosa, M., & Schiraldi, C. (2010). Production of capsular polysaccharide from *Escherichia coli* K4 for biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(6), 1779-1787.
- Collicec, S., Boissonvidal, C., & Jozefonvicz, J. (1994). A low-molecular-weight fucoidan fraction from the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry*, *35*(3), 697-700.
- Covis, Rudy, Vives, Thomas, Gaillard, Cédric, Benoit, Maud, & Benvegna, Thierry. (2015). Interactions and hybrid complex formation of anionic algal polysaccharides with a cationic glycine betaine-derived surfactant. *Carbohydr Polym*, *121*, 436-448. doi:10.1016/j.carbpol.2015.01.001
- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W. Q., Kasper, D., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. G. (2014). Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *Fems Microbiology Reviews*, *38*(4), 660-697. doi:10.1111/1574-6976.12056
- Crowther, M. A., & Warkentin, T. E. (2008). Bleeding risk and the management of bleeding complications in patients undergoing anticoagulant therapy: focus on new anticoagulant agents. *Blood*, *111*(10), 4871-4879. doi:10.1182/blood-2007-10-120543
- Cuthbertson, L., Kos, V., & Whitfield, C. (2010). ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 341.
- Darmon, Elise, & Leach, David R. F. (2014). Bacterial Genome Instability. *Microbiol Mol Biol Rev*, *78*(1), 1-39.
- Davis, B. R., Fanning, G. R., Madden, J. M., Steigerwalt, A. G., Bradford, H. B., Smith, H. L., & Brenner, D. J. (1981). Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J Clin Microbiol*, *14*(6), 631-639.
- DeAngelis, P. L., Jing, W., Drake, R. R., & Achyuthan, A. M. (1998). Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(14), 8454-8458.
- DeAngelis, P. L., Liu, J., & Linhardt, R. J. (2013). Chemoenzymatic synthesis of glycosaminoglycans: Re-creating, re-modeling and re-designing nature's longest or most complex carbohydrate chains. *Glycobiology*, *23*(7), 764-777.
- Deangelis, P. L., Papaconstantinou, J., & Weigel, P. H. (1993). Isolation of a *Streptococcus pyogenes* gene locus that directs hyaluronan biosynthesis in acapsular mutants and in heterologous bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(20), 14568-14571.
- Decho, A. W., & Gutierrez, T. (2017). Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 28. d
- Delbarre-Ladrat, Christine, Siquin, Corinne, Lebellenger, Lou, Zykwiniska, Agata, & Collicec-Jouault, Sylvia. (2014). Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules. *Frontiers in Chemistry*, *2*, 85.
- Dodgson, C., Amor, P., & Whitfield, C. (1996). Distribution of the *rol* gene encoding the regulator of lipopolysaccharide O-chain length in *Escherichia coli* and its influence on the expression of group I capsular K antigens. *Journal of Bacteriology*, *178*(7), 1895-1902.
- Doherty, D. H., Weaver, C. A., Miyamoto, K., & Minamisawa, T. (2014). Compositions and methods for bacterial production of chondroitin U.S. Patent No. 8,697,398. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Don, M. M., & Shoparwe, N. F. (2010). Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochemical Engineering Journal*, *49*(1), 95-103.
- Dunn, A. K. (2012). *Vibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and beyond. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Bacterial Respiratory Physiology* (Vol. 61, pp. 37-68). London: Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd.

- Esko, J. D., & Selleck, S. B. (2002). Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 435-471.
- Fagien, S., & Cassuto, D. (2012). Reconstituted injectable hyaluronic acid: expanded applications in facial aesthetics and additional thoughts on the mechanism of action in cosmetic medicine. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 130(1), 208-217.
- Fidopiastis, P. M., von Boletzky, S., & Ruby, E. G. (1998). A new niche for *Vibrio logei*, the predominant light organ symbiont of squids in the genus *Sepiolo*. *Journal of Bacteriology*, 180(1), 59-64.
- Filissettozzi, T., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197(1), 157-162.
- 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.
- Fong, J. C. N., Syed, K. A., Klose, K. E., & Yildiz, F. H. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*, 156, 2757-2769.
- Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., & Laurent, U. B. G. (1997). Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), 27-33.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29(8), 388-398.
- Fu, L., Suflita, M., & Linhardt, R. J. (2016). Bioengineered heparins and heparan sulfates. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 237-249.
- Garg, H. G., Cindhuchao, N., Quinn, D. A., Hales, C. A., Thanawiroon, C., Capila, I., & Linhardt, R. J. (2002). Heparin oligosaccharide sequence and size essential for inhibition of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Carbohydrate Research*, 337(21-23), 2359-2364.
- Glucksmann, M. A., Reuber, T. L., & Walker, G. C. (1993). Genes needed for the modification, polymerization, export and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti* - a model for succinoglycan biosynthesis. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 7045-7055.
- Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Matsumura, Y., Sawabe, T., Iida, T., Christen, R., . . . Sawabe, T. (2014). The Family Vibrionaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. The Prokaryotes - Gammaproteobacteria, 4th Edition. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag. p. 659-747.
- Goudenege, D., Boursicot, V., Versigny, T., Bonnetot, S., Ratiskol, J., Sinquin, C., . . . Delbarre-Ladrat, C. (2014). Genome sequence of *Vibrio diabolicus* and identification of the exopolysaccharide HE800 biosynthesis locus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(24), 10165-10176.
- Guerrini, M., Beccati, D., Shriver, Z., Naggi, A., Viswanathan, K., Bisio, A., . . . Sasisekharan, R. (2008). Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nature Biotechnology*, 26(6), 669-675.
- Gul, Nadia, & Poolman, Bert. (2013). Functional reconstitution and osmoregulatory properties of the ProU ABC transporter from *Escherichia coli*. *Molec Membrane Biol*, 30(2), 138-148.
- Guézennec, Jean, Moppert, Xavier, Raguénès, Gérard, Richert, Laurent, Costa, Bernard, & Simon-Colin, Christelle. (2011). Microbial mats in French Polynesia and their biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 46(1), 16-22.
- Hansen, H., Bjelland, A. M., Ronessen, M., Robertsen, E., & Willassen, N. P. (2014). LitR is a repressor of *syp* genes and has a temperature-sensitive regulatory effect on biofilm formation and colony morphology in *Vibrio (Aliivibrio) salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(17), 5530-5541.
- Harwood, C. R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives - molecular biological and industrial workhorses. *Trends in Biotechnology*, 10(7), 247-256.
- Hasan, N. A., Grim, C. J., Lipp, E. K., Rivera, I. N. G., Chun, J., Haley, B. J., . . . Colwell, R. R. (2015). Deep-sea hydrothermal vent bacteria related to human pathogenic *Vibrio* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(21), E2813-E2819.

- Hayashi, K., Hayashi, T., & Kojima, I. (1996). A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: *In vitro* and *ex vivo* evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *Aids Research and Human Retroviruses*, *12*(15), 1463-1471.
- Hazen, T. H., Lafon, P. C., Garrett, N. M., Lowe, T. M., Silberger, D. J., Rowe, L. A., . . . Sobecky, P. A. (2015). Insights into the environmental reservoir of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* using comparative genomics. *Frontiers in Microbiology*, *6*, 14.
- He, W. Q., Fu, L., Li, G. Y., Jones, J. A., Linhardt, R. J., & Koffas, M. (2015). Production of chondroitin in metabolically engineered *E. coli*. *Metabolic Engineering*, *27*, 92-100.
- Henares, B. M., Xu, Y. M., & Boon, E. M. (2013). A nitric oxide-responsive quorum sensing circuit in *Vibrio harveyi* regulates flagella production and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(8), 16473-16484.
- Hirsh, J., Anand, S. S., Halperin, J. L., & Fuster, V. (2001). Guide to anticoagulant therapy: Heparin a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, *103*(24), 2994-3018.
- Hou, J., Zheng, H. P., Chruszcz, M., Zimmerman, M. D., Shumilin, I. A., Osinski, T., . . . Minora, W. (2016). Dissecting the structural elements for the activation of beta-ketoacyl-(acyl carrier protein) reductase from *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, *198*(3), 463-476.
- Huang, W. C., Chen, S. J., & Chen, T. L. (2008). Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *40*(3), 460-464.
- Hussa, Elizabeth A., Darnell, Cynthia L., & Visick, Karen L. (2008). RscS functions upstream of SypG to control the *syp* locus and biofilm formation in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol*, *190*(13), 4576-4583.
- Im, J. H., Song, J. M., Kang, J. H., & Kang, D. J. (2009). Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus sp* ID9102 via a statistical approach. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *36*(11), 1337-1344. doi:10.1007/s10295-009-0618-8
- 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. doi:10.1139/cjm-2014-0595
- Iurciuc, C., Savin, A., Lungu, C., Martin, P., & Popa, M. (2016). Gellan - Food applications. *Cellulose Chemistry and Technology*, *50*(1), 1-13.
- Jagannath, S., & Ramachandran, K. B. (2010). Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal*, *48*(2), 148-158.
- Jansson, P. E., Lindberg, B., & Sandford, P. A. (1983). Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, *124*(1), 135-139.
- Jiang, Peng, Li, Jingbao, Han, Feng, Duan, Gaofei, Lu, Xinzhi, Gu, Yuchao, & Yu, Wengong. (2011). Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio sp.* QY101. *PLoS ONE*, *6*(4), e18514.
- Jin, P., Zhang, L. P., Yuan, P. H., Kang, Z., Du, G. C., & Chen, J. (2016). Efficient biosynthesis of polysaccharides chondroitin and heparosan by metabolically engineered *Bacillus subtilis*. *Carbohydrate Polymers*, *140*, 424-432.
- Johns, M. R., Goh, L. T., & Oeggerli, A. (1994). Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biotechnology Letters*, *16*(5), 507-512.
- Jonas, R., & Farah, L. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*, *59*(1-3), 101-106.
- Jong, A., Wu, C. H., Chen, H. M., Luo, F., Kwon-Chung, K. J., Chang, Y. C., . . . Huang, S. H. (2007). Identification and characterization of CPS1 as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryotic Cell*, *6*(8), 1486-1496.
- Jouault, S. C., Chevlot, L., Helley, D., Ratiskol, J., Bros, A., Siquin, C., . . . Fischer, A. M. (2001). Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, *1528*(2-3), 141-151.

- Kaji, T., Okabe, M., Shimada, S., Yamamoto, C., Fujiwara, Y., Lee, J. B., & Hayashi, T. (2004). Sodium spirulan as a potent inhibitor of arterial smooth muscle cell proliferation in vitro. *Life Sciences*, *74*(19), 2431-2439.
- Kallio, P. T., Kim, D. J., Tsai, P. S., & Bailey, J. E. (1994). Intracellular expression of Vitreoscilla hemoglobin alters *Escherichia coli* energy metabolism under oxygen-limited conditions. *The FEBS Journal*, *219*(1-2), 201-208.
- Kamerling, J. P., Gerwig, G. J., Vliegenthart, J. F. G., & Clamp, J. R. (1975). Characterization by gas-liquid chromatography-mass spectrometry and proton-magnetic-resonance spectroscopy of pertrimethylsilyl methyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycopeptides. *Biochemical Journal*, *151*(3), 491-495.
- Kamhi, E., Joo, E. J., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2013). Glycosaminoglycans in infectious disease. *Biological Reviews*, *88*(4), 928-943.
- Kapfhammer, Dagmar, Karatan, Ece, Pflughoeft, Kathryn J., & Watnick, Paula I. (2005). Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, *71*(7), 3840-3847.
- Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2011). Isolation and physico-chemical characterisation of extracellular polymeric substances produced by the marine bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Biofouling*, *27*(3), 309-317.
- Kavita, K., Mishra, A., & Jha, B. (2013). Extracellular polymeric substances from two biofilm forming *Vibrio* species: Characterization and applications. *Carbohydrate Polymers*, *94*(2), 882-888.
- Kazakov, A. E., Rodionov, D. A., Alm, E., Arkin, A. P., Dubchak, I., & Gelfand, M. S. (2009). Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in Proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, *191*(1), 52-64.
- Keenleyside, W. J., & Whitfield, C. (1996). A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(45), 28581-28592.
- Khrulnova, S. A., & Manukhov, I. V., & Zavil'gel'skii, G. B. (2011). "Quorum sensing" regulation and the structure of lux the operon in marine bacteria *Aliivibrio logei*. *Russian Journal of Genetics*, *47*(12), 1415-1421.
- Klemm, D. (1998). The DFG focus program cellulose and cellulose derivatives - Molecular and supramolecular structure design. *Papier*, *52*(12), 697-703.
- Kobo, M., Ando, K., Mimura, T., Matsusue, Y., & Mori, K. (2009). Chondroitin sulfate for the treatment of hip and knee osteoarthritis: Current status and future trends. *Life Sciences*, *85*(13-14), 477-483.
- Kogan, G., Soltes, L., Stern, R., & Gemeiner, P. (2007). Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, *29*(1), 17-25.
- Krahulec, I., Krahulcova, J., Medova, M., & Velebny, V. (2005). Influence of KfoG on capsular polysaccharide structure in *Escherichia coli* K4 strain. *Molecular Biotechnology*, *30*(2), 129-134.
- Krahulec, J., & Krahulcova, J. (2006). Increase in hyaluronic acid production by *Streptococcus equi subsp zooepidemicus* strain deficient in beta-glucuronidase in laboratory conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *71*(4), 415-422.
- Kreyenschulte, D., Krull, R., & Margaritis, A. (2014). Recent advances in microbial biopolymer production and purification. *Critical Reviews in Biotechnology*, *34*(1), 1-15.
- Kuberan, B., Beeler, D. L., Lech, M., Wu, Z. L. L., & Rosenberg, R. D. (2003). Chemoenzymatic synthesis of classical and non-classical anticoagulant heparan sulfate polysaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(52), 52613-52621.
- Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides - a perception. *Journal of Basic Microbiology*, *47*(2), 103-117.
- Gyles, C.L. (1994). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab International.
- Lehninger, A. (1982). Principles de Biochimie. In David L. & Nelson (Eds.). United States of America: Worth Publishers.
- Lahaye, M., & Robic, A. (2007). Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, *8*(6), 1765-1774.

- Lamoureux, F., Baud'huin, M., Duplomb, L., Heymann, D., & Redini, F. (2007). Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays*, 29(8), 758-771.
- Laurienzo, P. (2010). Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An overview. *Marine Drugs*, 8(9), 2435-2465.
- Lawrence, J. G., & Ochman, H. (1997). Amelioration of bacterial genomes: Rates of change and exchange. *Journal of Molecular Evolution*, 44(4), 383-397.
- Le Roux, F., Wegner, K. M., & Polz, M. F. (2016). Oysters and Vibrios as a model for disease dynamics in wild animals. *Trends in Microbiology*, 24(7), 568-580.
- Lee, K. J., Kim, J. A., Hwang, W., Park, S. J., & Lee, K. H. (2013). Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*. *Molecular Microbiology*, 90(4), 841-857.
- Leigh, J. A., & Walker, G. C. (1994). Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends in Genetics*, 10(2), 63-67.
- LeRoux, F., Wegner, K. M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C. R., Amaro, C., . . . Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio pathogens* in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Frontiers in Microbiology*, 6, 8.
- Liebert, T. (2009). Cellulose Solvents - Remarkable History, Bright Future. *Cellulose Solvents: for Analysis, Shaping and Chemical Modification*, 1033, 3-54.
- Lindahl, U., Li, J. P., Kusche-Gullberg, M., Salmivirta, M., Alaranta, S., Veromaa, T., . . . Casu, B. (2005). Generation of "Neoheparin" from *E coli* K5 capsular polysaccharide. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(2), 349-352.
- Linhardt, R. J. (2003). Heparin: Structure and biological activities. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 225, U253-U253.
- Liu, H. Y., Zhang, Z. Q., & Linhardt, R. J. (2009). Lessons learned from the contamination of heparin. *Natural Product Reports*, 26(3), 313-321.
- Liu, J., & Pedersen, L. C. (2007). Anticoagulant heparan sulfate: structural specificity and biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2), 263-272.
- Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., & Sun, J. (2008). Enhanced hyaluronic acid production by a two-stage culture strategy based on the modeling of batch and fed-batch cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology*, 99(17), 8532-8536.
- Liu, L., Liu, Y. F., Li, J. H., Du, G. C., & Chen, J. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10, 9.
- Liu, L., Wang, M., Du, G., & Chen, J. (2008). Enhanced hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus* by an intermittent alkaline-stress strategy. *Letters in Applied Microbiology*, 46(3), 383-388.
- Liu, Long, Liu, Yanfeng, Li, Jianghua, Du, Guocheng, & Chen, Jian. (2011). Microbial production of hyaluronic acid: current state, challenges, and perspectives. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 99.
- Liu, S. B., Chen, X. L., He, H. L., Zhang, X. Y., Xie, B. B., Yu, Y., . . . Zhang, Y. Z. (2013). Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas sp* strain SM20310. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 224-230.
- Liu, Y. F., Liu, L., Chen, J. H., Li, J. H., Du, G. C., & Chen, J. (2012). Effects of carbon sources and feeding strategies on heparosan production by *Escherichia coli* K5. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(7), 1209-1218.
- Locher, K. P., Lee, A. T., & Rees, D. C. (2002). The *E. coli* BtuCD structure: A framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, 296(5570), 1091-1098.
- Lopes, B. D., Lessa, V. L., Silva, B. M., Carvalho, M. A. D., Schnitzler, E., & Lacerda, L. G. (2015). Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(3), 185-194.
- Lovu, M., Dumais, G., & du Souich, P. (2008). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, S14-S18.

- Lynen, F. & Ochoa, S. (1953). Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 12, 299-314.
- Manzoni, M., Bergomi, S., & Cavazzoni, V. (1996). Production of K5 polysaccharides of different molecular weight by *Escherichia coli*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 11(4), 301-311.
- Mao, Z. & Chen, R. (2007). Recombinant synthesis of hyaluronan by *Agrobacterium sp.* *Biotechnology Progress*, 23(5), 1038-1042.
- Mao, Z., Shin, H.-D., & Chen, R. (2009). A recombinant *E. coli* bioprocess for hyaluronan synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 63-69.
- McCarty, M. F., Russell, A. L., & Seed, M. P. (2000). Sulfated glycosaminoglycans and glucosamine may synergize in promoting synovial hyaluronic acid synthesis. *Medical Hypotheses*, 54(5), 798-802.
- Microscope. <https://microscope.readthedocs.io/en/latest/>. Accessed 18 July 2017.
- Milewski, Sławomir. (2002). Glucosamine-6-phosphate synthase—the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1597(2), 173-192.
- Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R. R. B., Monsan, P., & Willemot, R. M. (1997). Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(4), 465-472.
- Montreuil, J., Spik, G., Chosson, A., Segard, E., & Scheppler, N. (1963). Methods of study of the structure of glycoproteins. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 18, 529–546.
- Montreuil, & J. (1986). Glycoproteines. In Carbohydrates analysis: a practical approach. In Chaplin, M.F. et Kennedy, J.F. (Eds.), IRL Press.
- Morris, A. R., Darnell, C. L., & Visick, K. L. (2011). Inactivation of a novel response regulator is necessary for biofilm formation and host colonization by *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 82(1), 114-130.
- Morris, A. R., & Visick, K. L. (2010). Control of biofilm formation and colonization in *Vibrio fischeri*: a role for partner switching? *Environmental Microbiology*, 12(8), 2051-2059.
- Morris, A. R., Darnell, C. L., & Visick, K. L. (2011). Inactivation of a novel response regulator is necessary for biofilm formation and host colonization by *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*, 82(1), 114-130.
- Morris, Andrew R., & Visick, Karen L. (2013a). Inhibition of SypG-induced biofilms and host colonization by the negative regulator SypE in *Vibrio fischeri*. *PLoS ONE*, 8(3), e60076.
- Morris, A. R., & Visick, KK L. (2013b). The response regulator SypE controls biofilm formation and colonization through phosphorylation of the syp-encoded regulator SypA in *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol*, 87(3), 509-525.
- Mourez, M., Hofnung, N., & Dassa, E. (1997). Subunit interactions in ABC transporters: A conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *Embo Journal*, 16(11), 3066-3077.
- Muralidharan, J., & Jayachandran, S. (2003). Physicochemical analyses of the exopolysaccharides produced by a marine biofouling bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *Process Biochemistry*, 38(6), 841-847.
- Nardella, A., Chaubet, F., BoissonVidal, C., Blondin, C., Durand, P., & Jozefonvicz, J. (1996). Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research*, 289, 201-208.
- NCBI Blast. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed April 2017.
- NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed December 2016.
- Nemoz, G., Robert-Baudouy, J., & Stoeber, F. (1976). Physiological and genetic regulation of the aldohexuronate transport system in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 127(2), 706-718.
- Nichols, C. A. M., Garon, S., Bowman, J. P., Ragueneas, G., & Guezennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1057-1066.

- Ninomiya, T., Sugiura, N., Tawada, A., Sugimoto, K., Watanabe, H., & Kimata, K. (2002). Molecular cloning and characterization of chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21567-21575.
- Norsworthy, A. N., & Visick, K. L. (2015). Signaling between two interacting sensor kinases promotes biofilms and colonization by a bacterial symbiont. *Molecular Microbiology*, 96(2), 233-248.
- Nwodo, Uchechukwu, Green, Ezekiel, & Okoh, Anthony. (2012). Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14002.
- Olendzenski, L., & Gogarten, J. P. (2009). Evolution of genes and organisms the tree/web of life in light of horizontal gene transfer. *Natural Genetic Engineering and Natural Genome Editing*, 1178, 137-145.
- Onishi, A., St Ange, K., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2016). Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 21, 1372-1392.
- Osmalek, T., Froelich, A., & Tasarek, S. (2014). Application of gellan gum in pharmacy and medicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 466(1-2), 328-340.
- Ozturk, S., Calik, P., & Ozdamar, T. H. (2016). Fed-Batch Biomolecule Production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. *Trends in Biotechnology*, 34(4), 329-345.
- Park, Y. I., Buszko, M. L., & Gander, J. E. (1997). Utilization of phosphocholine from extracellular complex polysaccharide as a source of cytoplasmic choline derivatives in *Penicillium fellutanum*. *J Bacteriol*, 179(4), 1186-1192.
- Petitou, M., Duchaussoy, P., Herbert, J. M., Duc, G., El Hajji, M., Branellec, J. F., . . . Garrigou, E. (2002). The synthetic pentasaccharide fondaparinux: First in the class of antithrombotic agents that selectively inhibit coagulation factor Xa. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 28(4), 393-402.
- Pfister, B., & Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(14), 2781-2807.
- Pires, A. M. B., Macedo, A. C., Eguchi, S. Y., & Santana, M. H. A. (2010). Microbial production of hyaluronic acid from agricultural resource derivatives. *Bioresource Technology*, 101(16), 6506-6509.
- Polard, P., & Chandler, M. (1995). Bacterial transposases and retroviral integrases. *Mol Microbiol*, 15(1), 13-23.
- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. *Marine Drugs*, 8(6), 1779-1802.
- Pomin, V. H. (2009). An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. *Biopolymers*, 91(8), 601-609.
- Powell, A. K., Yates, E. A., Fernig, D. G., & Turnbull, J. E. (2004). Interactions of heparin/heparan sulfate with proteins: Appraisal of structural factors and experimental approaches. *Glycobiology*, 14(4), 17R-30R.
- Prasad, S. B., Jayaraman, G., & Ramachandran, K. B. (2010). Hyaluronic acid production is enhanced by the additional co-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 273-283.
- Prasad, S. B., Ramachandran, K. B., & Jayaraman, G. (2012). Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), 1593-1607.
- Raguenes, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P., & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 989-995.
- Raguenes, G. H. C., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M., . . . Guezennec, J. G. (1997). *Alteromonas infernus* sp nov, a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Microbiology*, 82(4), 422-430.
- Ray, V. A., Eddy, J. L., Hussa, E. A., Misale, M., & Visick, K. L. (2013). The syp enhancer sequence plays a key role in transcriptional activation by the sigma(54)- dependent response regulator SypG

- and in biofilm formation and host colonization by *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 195(23), 5402-5412.
- Rederstorff, E., Weiss, P., Sourice, S., Pilet, P., Xie, F., Siquin, C., . . . Laïb, S. (2011). An in vitro study of two GAG-like marine polysaccharides incorporated into injectable hydrogels for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(5), 2119-2130.
- Reeves, Peter R., Hobbs, Matthew, Valvano, Miguel A., Skurnik, Mikael, Whitfield, Chris, Coplin, David, . . . Rick, Paul D. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology*, 4(12), 495-503.
- Restaino, O. F., Cimini, D., De Rosa, M., Catapano, A., & Schiraldi, C. (2011). High cell density cultivation of *Escherichia coli* K4 in a microfiltration bioreactor: a step towards improvement of chondroitin precursor production. *Microbial Cell Factories*, 10, 10.
- Restaino, O. F., di Lauro, I., Cimini, D., Carlino, E., De Rosa, M., & Schiraldi, C. (2013). Monosaccharide precursors for boosting chondroitin-like capsular polysaccharide production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(4), 1699-1709.
- Restaino, O. F., di Lauro, I., Di Nuzzo, R., De Rosa, M., & Schiraldi, C. (2017). New insight into chondroitin and heparosan-like capsular polysaccharide synthesis by profiling of the nucleotide sugar precursors. *Bioscience Reports*, 37, 11.
- Reverchon, S., & Nasser, W. (2013). Dickeya ecology, environment sensing and regulation of virulence programme. *Environmental Microbiology Reports*, 5(5), 622-636.
- Rigouin, C., Delbarre-Ladrat, C., Ratiskol, J., Siquin, C., Collic-Jouault, S., & Dion, M. (2012). Screening of enzymatic activities for the depolymerisation of the marine bacterial exopolysaccharide HE800. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(1), 143-151.
- Rimington, C. (1931). The carbohydrate complex of the serum proteins: Improved method for isolation and re-determination of structure. Isolation of glucosaminodimannose from proteins of ox blood. *Biochemical Journal*, 25(4), 1062.
- Rizzo, L., Frascchetti, S., Alifano, P., Tredici, M. S., & Stabili, L. (2016). Association of *Vibrio* community with the Atlantic Mediterranean invasive alga *Caulerpa cylindracea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 475, 129-136.
- Rodriguez, M. L., Jann, B., & Jann, K. (1988). Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5: K4: H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone. *The FEBS Journal*, 177(1), 117-124.
- Roman, E., Roberts, I., Lidholt, K., & Kusche-Gullberg, M. (2003). Overexpression of UDP-glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* results in decreased biosynthesis of K5 polysaccharide. *Biochemical Journal*, 374, 767-772.
- Romick, T. L., & Fleming, H. P. (1998). Acetoin production as an indicator of growth and metabolic inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 18-24.
- Romling, U. (2002). Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Research in Microbiology*, 153(4), 205-212.
- Ronca, F., Palmieri, L., Panicucci, P., & Ronca, G. (1998). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis and Cartilage*, 6, 14-21.
- Roohvand, F., Shokri, M., Abdollahpour-Alitappeh, M., & Ehsani, P. (2017). Biomedical applications of yeast- a patent view, part one: yeasts as workhorses for the production of therapeutics and vaccines. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(8), 929-951.
- Rottava, I., Batesini, G., Silva, M. F., Lerin, L., de Oliveira, D., Padilha, F. F., . . . Treichel, H. (2009). Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas sp.* *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 65-71.
- Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., & Guezennec, J. (1999a). Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr Res*, 322(1-2), 40-45.
- Rougeaux, H., Kervarec, N., Pichon, R., & Guezennec, J. (1999b). Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research*, 322(1-2), 40-45.

- Ruby, E. G., & Lee, K. H. (1998). The *Vibrio fischeri* *Euprymna scolopes* light organ association: Current ecological paradigms. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 805-812.
- Sa-Correia, I., Fialho, A. M., Videira, P., Moreira, L. M., Marques, A. R., & Albano, H. (2002). Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(4), 170-176.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4), 406-425.
- Sawabe, Tomoo, Ogura, Yoshitoshi, Matsumura, Yuta, Gao, Feng, Amin, AKM Rohul, Mino, Sayaka, . . . Hayashi, Testuya. (2013). Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov. *Front Microbiol*, 4, 414.
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6, 24.
- Schmid, J., Sperl, N., & Sieber, V. (2014). A comparison of genes involved in sphingane biosynthesis brought up to date. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(18), 7719-7733.
- Senni, K., Gueniche, F., Changotade, S., Septier, D., Siquin, C., Ratiskol, J., . . . Collic-Jouault, S. (2013). Unusual glycosaminoglycans from a deep sea hydrothermal bacterium improve fibrillar collagen structuring and fibroblast activities in engineered connective tissues. *Marine Drugs*, 11(4), 1351-1369.
- Senni, K., Pereira, J., Gueniche, F., Delbarre-Ladrat, C., Siquin, C., Ratiskol, J., . . . Collic-Jouault, S. (2011). Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Marine Drugs*, 9(9), 1664-1681.
- Serfozo, Z., & Elekes, K. (2010). Chemical properties of the extracellular matrix of the snail nervous system: A comprehensive study using a combination of histochemical techniques. *Micron*, 41(5), 461-471.
- Shao, Z. Y., Zhao, H., & Zhao, H. M. (2009). DNA assembler, an in vivo genetic method for rapid construction of biochemical pathways. *Nucleic Acids Research*, 37(2), 10.
- Shibata, S., Yip, E. S., Quirke, K. P., Ondrey, J. M., & Visick, K. L. (2012). Roles of the structural symbiosis polysaccharide (syp) genes in host colonization, biofilm formation, and polysaccharide biosynthesis in *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 194(24), 6736-6747.
- Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R. V., . . . Miller, R. J. (2004). Evaluation of hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules*, 5(6), 2122-2127.
- Shingler, V. (2011). Signal sensory systems that impact Sigma 54-dependent transcription. *Fems Microbiology Reviews*, 35(3), 425-440.
- Simelyte, E., Rimpilainen, M., Zhang, X., & Toivanen, P. (2003). Role of peptidoglycan subtypes in the pathogenesis of bacterial cell wall arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(10), 976-982.
- Siquin, C., Collic-Jouault, S. (2014). Les polysaccharides marins et leurs applications dans le domaine de la santé. *Techniques de l'Ingénieur*, BIO650, 1-20.
- Sone, Y. F., Nikoloff, J. M., & Zhang, D. W. (2015). Improving protein production on the level of regulation of both expression and secretion pathways in *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 963-977.
- Song, A. A. L., In, L. L. A., Lim, S. H. E., & Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*, 16, 15.
- Stern, R., Asari, A. A., & Sugahara, K. N. (2006). Hyaluronan fragments: An information-rich system. *European Journal of Cell Biology*, 85(8), 699-715.
- Stredansky, M. (2005). Succinoglycan Polysaccharides. *Biopolymers online*.
- Stines-Chaumeil, C., Talfournier, F., & Branlant, G. (2006). Mechanistic characterization of the MSDH (methylmalonate semialdehyde dehydrogenase) from *Bacillus subtilis*. *Biochemical Journal*, 395, 107-115.
- Sutherland, I.W. (1972). Bacterial Exopolysaccharides. *Advances in Microbiol Physiology*, 8, 143-213.

- Synowiecki, J., & Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *43*(2), 145-171.
- Sze, J. H., Brownlie, J. C., & Love, C. A. (2016). Biotechnological production of hyaluronic acid: a mini review. *3 Biotech*, *6*(1), 67.
- Tammi, R. H., Kultti, A., Kosma, V. M., Pirinen, R., Auvinen, P., & Tammi, M. I. (2008). Hyaluronan in human tumors: Pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan. *Seminars in Cancer Biology*, *18*(4), 288-295.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, *30*(12), 2725-2729.
- Taylor, C. M., Goldrick, M., Lord, L., & Roberts, I. S. (2006). Mutations in the waaR gene of *Escherichia coli* which disrupt lipopolysaccharide outer core biosynthesis affect cell surface retention of group 2 capsular polysaccharides. *Journal of Bacteriology*, *188*(3), 1165-1168.
- Tercero-Albuero, J. J., Gonzalez-Marquez, H., Bonilla-Gonzalez, E., Quinones-Ramirez, E. I., & Vazquez-Salinas, C. (2014). Identification of capsule, biofilm, lateral flagellum, and type IV pili in *Vibrio mimicus* strains. *Microbial Pathogenesis*, *76*, 77-83.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(2), 211-222.
- Thompson, F. L., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(3), 403-431.
- Tillmans, J., & Philippi, K. (1929). Über den Gehalt der wichtigsten Proteine des Nahrungsmittel an Kohlehydraten und über ein kolorimetrisches Verfahren zue quantitativen Bestimmung von stickstofffreien Zucker in Eiweiss. *Biochemische Zeitschrift*, *215*, 36-60.
- Urbinati, C., Bugatti, A., Oreste, P., Zoppetti, G., Waltenberger, J., Mitola, S., . . . Rusnati, M. (2004). Chemically sulfated *Escherichia coli* K5 polysaccharide derivatives as extracellular HIV-1 Tat protein antagonists. *Febs Letters*, *568*(1-3), 171-177.
- Usov, A. I., & Bilan, M. I. (2009). Fucoidans - sulfated polysaccharides of brown algae. *Russian Chemical Reviews*, *78*(8), 785-799.
- van der Meer, J. Y., Kellenbach, E., & van den Bos, L. J. (2017). From farm to pharma: An overview of industrial heparin manufacturing methods. *Molecules*, *22*(6), 13.
- van Dijk, J., & Hecker M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to supersecreting cell factory. *Microbial Cell Factories*, *12*(1), 3.
- Vanhooren, P., & Vandamme, E.J.. (1998). Biosynthesis, physio-logical role, use and fermentation process characteristics of bacterial exopolysaccharides. *Recent research developments in fermentation & bioengineering*, 253-300.
- Vasina, J. A., & Baneyx, F. (1997). Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: A comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. *Protein Expression and Purification*, *9*(2), 211-218.
- Vazquez, J. A., Montemayor, M. I., Fraguas, J., & Murado, M. A. (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial Cell Factories*, *9*, 10.
- Vazquez, J. A., Rodriguez-Amado, I., Montemayor, M. I., Fraguas, J., Gonzalez, M. D., & Murado, M. A. (2013). Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A Review. *Marine Drugs*, *11*(3), 747-774.
- Velasco, C. R., Baud'huin, M., Siquin, C., Maillason, M., Heymann, D., Collic-Jouault, S., & Padrines, M. (2011). Effects of a sulfated exopolysaccharide produced by *Altermonas infernus* on bone biology. *Glycobiology*, *21*(6), 781-795.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Repetto, B., Stauder, M., Giusto, G., & Pruzzo, C. (2008). A general role for surface membrane proteins in attachment to chitin particles and copepods of environmental and clinical vibrios. *Letters in Applied Microbiology*, *46*(1), 119-125.

- Villarreal-Chiu, J., Quinn, J., & McGrath, J. (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front Microbiol*, 3(19).
- Visick, K. L. (2009). An intricate network of regulators controls biofilm formation and colonization by *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 74(4), 782-789.
- Volpi, N., Maccari, F., & Titze, J. (2005). Simultaneous detection of submicrogram quantities of hyaluronic acid and dermatan sulfate on agarose-gel by sequential staining with toluidine blue and Stains-All. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 820(1), 131-135.
- Vorhoelter, F. J., Schneiker, S., Goesmann, A., Krause, L., Bekel, T., Kaiser, O., . . . Puehler, A. (2008). The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B 100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis. *Journal of Biotechnology*, 134(1-2), 33-45.
- Wang, Z., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2011). *Escherichia coli* K5 heparosan fermentation and improvement by genetic engineering. *Bioengineered Bugs*, 2(1), 63-67.
- Wang, Y., Hollingsworth, R. I., & Kasper, D. L. (1999). Ozonolytic depolymerization of polysaccharides in aqueous solution. *Carbohydrate Research*, 319(1-4), 141-147.
- Wang, Z. Y., Ly, M., Zhang, F. M., Zhong, W. H., Suen, A., Hickey, A. M., . . . Linhardt, R. J. (2010). *E. coli* K5 fermentation and the preparation of heparosan, a bioengineered heparin precursor. *Biotechnology and Bioengineering*, 107(6), 964-973.
- Weigel, P. H., & DeAngelis, P. L. (2007). Hyaluronan synthases: A decade-plus of novel glycosyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 36777-36781.
- Wessels, M. R., Moses, A. E., Goldberg, J. B., & Dicesare, T. J. (1991). Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A streptococci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), 8317-8321.
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 39-68.
- Widner, B., Behr, R., Von Dollen, S., Tang, M., Heu, T., Sloma, A., . . . Brown, S. (2005). Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 3747-3752.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11-19.
- Woodward, R., Yi, W., Li, L., Zhao, G. H., Eguchi, H., Sridhar, P. R., . . . Wang, P. G. (2010). In vitro bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nature Chemical Biology*, 6(6), 418-423.
- Xu, P., Vansiri, A., Bhan, N., & Koffas, M. A. G. (2012). ePathBrick: A synthetic biology platform for engineering metabolic pathways in *E. coli*. *Acs Synthetic Biology*, 1(7), 256-266.
- Yildiz, F. H., & Visick, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 17(3), 109-118.
- Yip, E. S., Geszvain, K., DeLoney-Marino, C. R., & Visick, K. L. (2006). The symbiosis regulator RscS controls the *syj* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 62(6), 1586-1600.
- Yip, E. S., Grublesky, B. T., Husa, E. A., & Visick, K. L. (2005). A novel, conserved cluster of genes promotes symbiotic colonization and sigma(54)-dependent biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *Molecular Microbiology*, 57(5), 1485-1498.
- Yoon, S. S., & Mekalanos, J. J. (2006). 2,3-Butanediol synthesis and the emergence of the *Vibrio cholerae* El Tor biotype. *Infection and Immunity*, 74(12), 6547-6556.
- Yoshizawa, S., Tsuruya, Y., Fukui, Y., Sawabe, T., Yokota, A., Kogure, K., . . . Thompson, F. L. (2012). *Vibrio jasicida* sp nov., a member of the Harveyi clade, isolated from marine animals (packhorse lobster, abalone and Atlantic salmon). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1864-1870.
- Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other Bacteria: Paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annual Review of Microbiology*, 65, 563-581.

- Yu, H. M., & Stephanopoulos, G. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. *Metabolic Engineering*, *10*(1), 24-32.
- Yun, E. J., Kwak, S., Kim, S. R., Park, Y. C., Jin, Y. S., & Kim, K. H. (2015). Production of (S)-3-hydroxybutyrate by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, *209*, 23-30.
- Zanchetta, P., Lagarde, N., & Guezennec, J. (2003a). A new bone-healing material: A hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif Tissue Int*, *72*(1), 74-79.
- Zanchetta, P., Lagarde, N., & Guezennec, J. (2003b). Systemic effects on bone healing of a new hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcified Tissue International*, *73*(3), 232-236.
- Zanfardino, A., Restaino, O. F., Notomista, E., Cimini, D., Schiraldi, C., De Rosa, M., . . . Varcamonti, M. (2010). Isolation of an *Escherichia coli* K4 kfoC mutant over-producing capsular chondroitin. *Microbial Cell Factories*, *9*, 8.
- Zevenhuizen, L. P. T. M. (1997). Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers*, *33*(2-3), 139-144.
- Zhang, C. Y., Liu, L., Teng, L. P., Chen, J. H., Liu, J., Li, J. H., . . . Chen, J. (2012). Metabolic engineering of *Escherichia coli* BL21 for biosynthesis of heparosan, a bioengineered heparin precursor. *Metabolic Engineering*, *14*(5), 521-527.
- Zhang, X., Zhang, R. Z., Bao, T., Yang, T. W., Xu, M. J., Li, H. Z., . . . Rao, Z. M. (2013). Moderate expression of the transcriptional regulator ALsR enhances acetoin production by *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *40*(9), 1067-1076.
- Zhang, Z. Q., McCallum, S. A., Xie, J., Nieto, L., Corzana, F., Jimenez-Barbero, J., . . . Linhardt, R. J. (2008). Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors. *Journal of the American Chemical Society*, *130*(39), 12998-13007.
- Zhou, Y. J., Hao, X. F., Tian, Z. J., Tong, G. Z., Yoo, D., An, T. Q., . . . Yuan, X. F. (2008). Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, *55*(3-4), 152-164.

Thèse de Doctorat

Lou LEBELLENGER

Etude de la biosynthèse d'un polysaccharide bactérien : vers la production recombinante d'hétéropolysaccharide.

Study of a bacterial polysaccharide biosynthesis : towards the recombinant production of heteropolysaccharide.

Résumé

La bactérie *Vibrio diabolicus* produit un exopolysaccharide (EPS) appelé HE800. Le HE800, sous sa forme native, a déjà montré des propriétés cicatrisantes comme implant de comblement osseux ; il est actuellement étudié pour des applications en cosmétique ou en santé humaine en tant que glycosaminoglycane-mimétique. Pour des applications biotechnologiques, les structures chimiques des polysaccharides doivent être contrôlées ; le rendement de production peut aussi être un verrou technologique. Cependant, les mécanismes moléculaires de la biosynthèse et les régulations ne sont pas toujours bien connus. Le cluster génétique de la biosynthèse de cet EPS a été décrit en 2014. L'objectif de ce présent travail était d'obtenir une production recombinante du HE800 dans *Escherichia coli*, afin d'approfondir la connaissance de ses mécanismes de biosynthèse.

Lors de cette thèse, une étude comparative chez les Vibrionaceae, par bioinformatique, de clusters génétiques de biosynthèse d'EPS similaires à celui du HE800 a montré qu'il était largement distribué puisqu'il est présent chez 70% des 103 génomes étudiés. Le cluster de gènes responsable de la production du HE800 a été cloné chez *Escherichia coli*. De nombreux tests ont été réalisés mais aucune production recombinante n'a été obtenue montrant la complexité des mécanismes de la biosynthèse et de sa régulation. Ces mécanismes ont été examinés par analyse transcriptomique de la bactérie *V. diabolicus* au cours de la biosynthèse du HE800. De plus, des études transcriptionnelles par qPCR chez *V. diabolicus* et la souche recombinante ont, par ailleurs, permis de mettre en évidence le rôle de la protéine SypG dans la régulation du cluster.

Mots clés

Vibrio diabolicus, polysaccharides, HE800, GAG-mimétiques, biosynthèse.

Abstract

The marine bacteria *Vibrio diabolicus* produces an exopolysaccharide (EPS) called HE800. The native form of HE800 has already shown biological efficiency in bone healing. It is studied as glycosaminoglycan-mimetic for applications in cosmetic and human health. To enhance biotechnological applications of polysaccharides, the chemical structures should be properly controlled; moreover, the production yield could also be a bottleneck. The genetic cluster of the HE800 EPS biosynthesis has been identified in 2014. However, the biosynthesis molecular mechanisms and regulations remain sometimes unclear. The main objective of this work is to obtain a recombinant production of the HE800 EPS in the common host *Escherichia coli*, to improve the knowledge of its biosynthesis mechanisms.

During this thesis, a comparative study in Vibrionaceae genomes was conducted to identify EPS biosynthesis genetic clusters similar to the HE800 one; it reveals that this cluster is largely widespread and present in 70 % of the 103 genomes studied. The gene cluster responsible for the HE800 production has been cloned in *Escherichia coli*. Many tests were performed, but no recombinant production was obtained, showing the complexity of the biosynthesis mechanisms and regulation. These mechanisms were further investigated by transcriptomic analysis of *V. diabolicus* upon HE800 biosynthesis. In addition, qPCR transcriptional studies of *V. diabolicus* and of the recombinant strain have highlighted the SypG protein importance in the cluster expression regulation.

Key Words

Vibrio diabolicus, polysaccharides, HE800, GAG-mimetics, biosynthesis.