

Sélection et mise en oeuvre "optimale" de souches microbiennes en bioréacteur, pour la production d'acide hyaluronique

Pierrick Leblanc

▶ **To cite this version:**

Pierrick Leblanc. Sélection et mise en oeuvre "optimale" de souches microbiennes en bioréacteur, pour la production d'acide hyaluronique. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0228 . tel-01751238

HAL Id: tel-01751238
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751238

Submitted on 6 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE DE LORRAINE (UL)

Ecole doctorale des Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP – UMR 7274 du CNRS)

THESE

Présentée à l'université de Lorraine par

Pierrick LEBLANC

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques

SELECTION ET MISE EN OEUVRE « OPTIMALE » DE SOUCHES MICROBIENNES EN BIOREACTEUR, POUR LA PRODUCTION D'ACIDE HYALURONIQUE

Soutenue publiquement le 05 décembre 2014

Membres du jury

Rapporteurs : Catherine BEAL, Professeur des Universités, AgroParisTech, CEBAI - Paris

Stéphane GUILLOUET, Professeur des Universités, INSA, LISBP - Toulouse

Examinateurs : Ivan Marc, Directeur de recherche, CNRS, LRGP, Nancy

Emmanuel RONDAGS, Maitre de conférences, UL , LRGP – Nancy

Invités : Stéphane DELAUNAY, Professeur des Universités – UL, LRGP – Nancy

Stéphane MEUNIER, Directeur R&D, Industriel – Génève

DOCUMENT CONFIDENTIEL

- Nomenclature -

- $\mathring{\gamma}$: taux de cisaillement moyen (s^{-1})
- γ : taux de cisaillement (s^{-1})
- [AH] : concentration en AH (g/L)
- [X] : concentration en biomasse (g/L)
- °C : degré Celsius
- μ : taux de croissance (h^{-1})
- μ_a : viscosité dynamique (Pa.s)
- A, α et β : constantes dépendant du dimensionnement du bioréacteur
- C : concentration ($mol.L^{-1}$)
- C* : concentration de saturation en oxygène ($mol.L^{-1}$)
- d : diamètre des mobile d'agitation (m)
- dn**/** dc : incrément d'indice de réfraction spécifique (mL/g)
- g : constante de gravité
- K : indice de consistence
- Ki : constante instrumentale
- K_La : transfert d'oxygène (h^{-1})
- k_s : constante dépendant du type de mobile d'agitation
- Mw : la masse molaire moyenne (Da)
- N : fréquence d'agitation (rev/sec)
- n : indice de comportement de flux
- n : nombre de mobiles d'agitation
- Np : nombre de puissance
- P : produit
- P_0 : puissance dissipée en conditions non aérées ($kg.m^2.s^{-3}$)
- P_g : puissance dissipée en conditions aérées ($kg.m^2.s^{-3}$)
- pO_2 : pression partielle en oxygène dissous (%)
- Q : débit d'aération (m^3/h)
- R(θ) : signal mesuré par la diffusion de la lumière aux faibles angles
- $r'''O_2$: vitesse volumique de consommation d'oxygène ($mol\ O_2.h^{-1}$)
- R^2 : coefficient de détermination ou de corrélation
- Re ; nombre de Reynolds
- rH : potentiel d'oxydo-réduction (mV)
- S : substrat
- U / mL : unité enzymatique par millilitre
- U_g : vitesse superficiel du gaz (m/h)
- V : volume (L)
- w : hauteur cumulée des mobiles d'agitation (m)
- X : biomasse
- $Y_{P/S}$: rendement de conversion du substrat en produit (g/g)
- $Y_{P/X}$: « rendement » de production de produit rapporté à la biomasse (production spécifique) (g/g)
- η : vitesse spécifique de consommation de substrat (g/g.h)
- π : vitesse spécifique de formation des produits (g/g.h)
- ρ : densité volumique (kg/m^3)

- Abréviations -

ADN : acide désoxyribonucléique

AH : acide hyaluronique

ATCC : american type culture collection

ATP : adénosine triphosphate

BHI : brain heart infusion broth

cell = cellule

CIG : concentration initiale en glucose

CLHP : chromatogrpahie liquide haute performance

CTAB : cetyl trimethylammonium bromide

Da : dalton

DO : densité optique

Glc : glucose

GPC : chromatographie sur gel perméable (GPC)

LAI : milieu LAI (Lai et al., 2011)

LRGP : laboratoire réactions et génie des procédés

MMR : mismatch repair

mn : minute

m/v : masse pour volume

MSR : méthode de surface de réponse

NCBI : national centrer for biotechnology information

NTG : n-méthyl N'nitro N-nitrosoguanidine

PBS : tampon phosphate salin

PEG: polyéthylène glycol

PEO : oxyde de polyéthylène

PKN : Patil Kim Nielsen

qsp : quantité suffisante pour

SDS : sodium dodecyl sulfate

tr/mn : tour par minute

UDO : unité de densité optique

vvm : volume d'air par volume de milieu

v/v : volume à volume

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE ..... p 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... p 5

MATERIEL ET METHODES..... p 44

RESULTATS ET DISCUSSION ..... p 70

CHAPITRE I..... **p 71**

CHAPITRE II..... **p 92**

CHAPITRE III..... **p 109**

CHAPITRE IV..... **p 149**

CHAPITRE V..... **p 191**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... p 218

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... p 225

INTRODUCTION GENERALE

L'acide hyaluronique est un exopolysaccharide de la famille des glycosaminoglycanes. Cette molécule d'intérêt est naturellement retrouvée au niveau de la matrice extracellulaire chez l'homme et participe donc efficacement à la formation du tissu conjonctif. Il se situe principalement au niveau du derme (50 %), des articulations mais aussi des yeux où il assure des fonctions naturelles d'hydratation ou de lubrification. A titre d'exemple, un corps humain de 60 kg contient approximativement 12 g d'acide hyaluronique.

Cette molécule, de par ses nombreuses propriétés physico-chimiques, est actuellement très prisée (ID) dans des domaines aussi variés que la chirurgie réparatrice, la thérapie anticancéreuse ou encore la cosmétique. Ainsi, l'acide hyaluronique s'impose comme une molécule à forte valeur ajoutée au regard de ses nombreuses propriétés physiques et biologiques :

- haut pouvoir hygroscopique. L'acide hyaluronique possède la capacité de retenir jusqu'à 1000 fois son poids en eau et participe ainsi activement à l'hydratation des tissus ;
- comportement viscoélastique. Cette propriété est naturellement retrouvée à l'état physiologique au niveau des articulations et assure ainsi un rôle d'amortissement ;
- propriété non-immunogène, qui offre des possibilités d'applications dans des processus de cicatrisation et de régénération tissulaire.

L'acide hyaluronique est ainsi impliqué dans des processus de structuration tissulaire et de cicatrisation mais est aussi impliqué, de par son rôle dans la signalisation cellulaire, dans les processus d'angiogénèse et d'inflammation (pouvoir antagoniste en fonction de la taille moléculaire de l'acide hyaluronique).

L'acide hyaluronique, présent chez tous les vertébrés, était extrait, à l'origine, à partir de tissus tels que les crêtes de coq. Depuis plusieurs années la production par voie microbienne, à partir de souches bactériennes telles que celles de *Streptococcus zooepidemicus,* est préférée. Cette espèce bactérienne, connue comme pathogène chez le cheval, est en effet naturellement productrice de la molécule d'acide hyaluronique qui joue un rôle de facteur de virulence au cours de son processus d'infection. Cette nouvelle voie d'obtention représente ainsi une alternative de choix puisqu'elle n'est pas sujette à la réglementation et aux risques sanitaires de plus en plus présents, en considération de ces produits d'origine animale. De plus, sa production est moins coûteuse et les méthodes de purification sont simplifiées.

Néanmoins, si l'on s'en réfère à la littérature, ce procédé de production n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît. En effet, les tailles moléculaires produites vont conditionner l'application qui sera faite de la molécule. Mais, quels seront les facteurs ou paramètres sur lesquels il faudra travailler pour maîtriser et / ou tenter d'améliorer un tel procédé ? Les manquements identifiés dans la littérature nous conduisent à des questions plus précises. Quelles sont les performances associées à des souches naturellement retrouvées sur des sites infectieux chez le cheval (souches « environnementales ») ? Et de manière associée, est-ce que la production de tailles moléculaires précises est dépendante des souches utilisées ? Cette dernière question nous a conduits à nous interroger sur l'implication croisée des conditions de mise en œuvre. Plusieurs aspects, les plus discutés dans la littérature, ont attiré notre attention. En effet, existe-t-il réellement une compétition métabolique entre production de biomasse et production d'AH, ou est-ce que ces deux productions sont associées ? Une fois cette question renseignée, quelle base de milieu de culture sera la plus à même d'améliorer ces deux productions. Quelles sources énergétiques et carbonées utiliser ? Quelles sources azotées ? De plus, quelles conditions de mise en œuvre et plus particulièrement d'oxygénation favoriseraient la production d'AH sans pour autant impliquer une diminution de la production de biomasse ?

Dans ce cadre général, l'objectif de cette thèse (synthétisé Figure 1) tend en une acquisition de connaissances provenant des lacunes observées dans la littérature. La question qui a ensuite initié notre démarche était la suivante.

« Quels moyens cognitifs et techniques doivent être développés dans le but de comprendre, de mettre en œuvre et d'améliorer, en terme de taille et de concentration, la production in vitro (bioréacteur) d'acide hyaluronique chez une souche de *Streptococcus zooepidemicus* naturellement retrouvée sur des sites infectieux chez les animaux ? »

L'objectif est donc d'identifier les facteurs limitants majeurs liés à ce type de procédé, et ce, dans deux compartiments classiques : la souche et sa physiologie d'une part, et sa mise en œuvre en réacteur d'autre part (partie I - « Etude bibliographique », présentée sous la forme d'une revue).

Par la suite, le matériel et méthodes, destiné à cette étude, sera présenté dans la partie II de cette thèse. Les différentes souches à disposition seront ainsi présentées (souche de référence issue d'une collection et souches dites « environnementales »). De plus, les outils de culture et les analyses associées seront détaillés.

Au vu des objectifs préalablement cités, et des facteurs limitants identifiés, une phase amont de développement de certaines de ces méthodes analytiques sera mise en place pour assurer un suivi cinétique complet chez ces différentes souches (quantification et caractérisation de toutes les entrées ou substrats et de toutes les sorties ou produits). Cette première étape posera les bases d'une étude des phénomènes métaboliques intervenant au cours de la synthèse d'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus* afin d'identifier des caractéristiques discriminatoires essentielles à un criblage de souche. Les résultats associés seront détaillés dans le Chapitre I de la partie « Résultats ».

La suite de la partie « Résultats » (chapitres II, III et IV) proposera une double progression : souche (sélection voire obtention par mutagénèse aléatoire d'un organisme aux performances de production accrues) et conditions de mise en œuvre (formulation d'un milieu de culture, étude des conditions de mise en œuvre).

Une synthèse expérimentale (Chapitre V) sera ensuite présentée dans le but de proposer une ébauche d'un procédé final de production d'acide hyaluronique microbien à l'échelle du laboratoire avec l'identification de facteurs clés pour une extrapolation potentielle à plus grande échelle.

Enfin, des conclusions sur les acquis scientifiques et techniques, associées à des perspectives d'études à poursuivre ou à explorer, seront présentées dans une quatrième et ultime partie (IV).

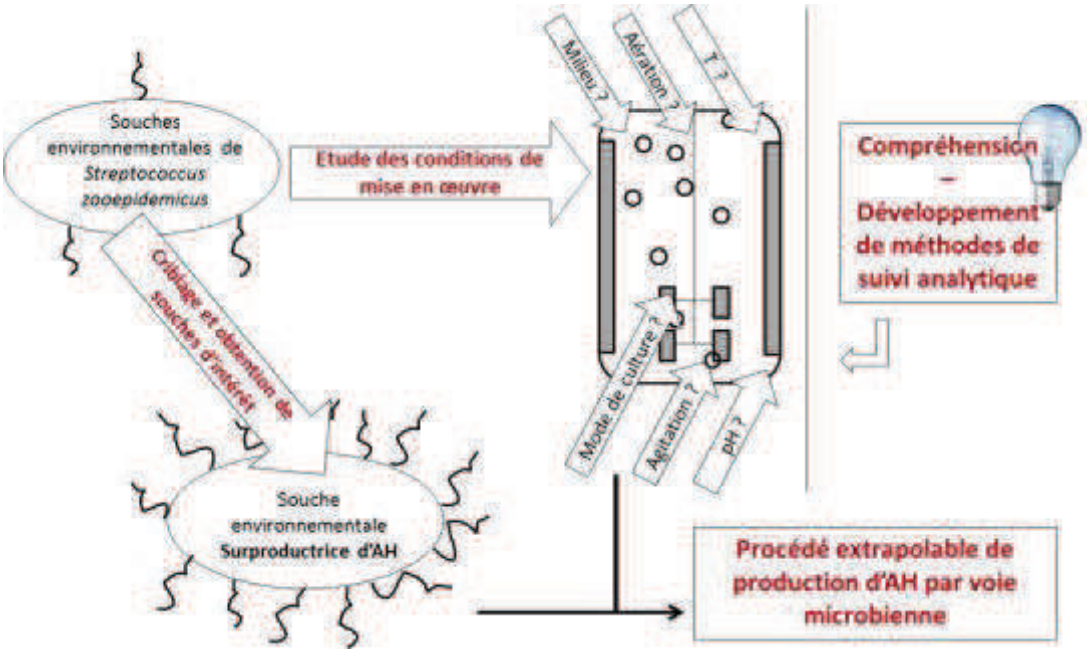


Figure 1 *Schéma représentatif de la démarche globale de cette thèse.*

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Document confidentiel

SOMMAIRE DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION 8

2. HA PROPERTIES AND APPLICATIONS 9

2.1. PROPERTIES 9
2.2. APPLICATIONS 10

3. HA SOURCING 12

3.1. ANIMAL AND MAMALIAN HA 12
3.2. MICROBIAL HA 13
3.2.1. PRODUCING ORGANISMS 13
3.2.2. HA FUNCTIONS IN STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS 14
3.2.3. BIOSYNTHETIC PATHWAY 15
3.2.4. HA DEGRADATION 16

4. MICROBIAL HA PRODUCTION AND QUALITY OPTIMIZATION 19

4.1. LAB SCALE PROCESS DEVELOPMENT 21
4.1.1. STRAIN(S) ENGINEERING 22
4.1.1.1. RANDOM MUTAGENESIS 22
4.1.1.2. METABOLIC ENGINEERING 23
4.1.2. CULTURE MEDIUM OPTIMIZATION 25
4.1.3. PHYSICOCHEMICAL CULTIVATION CONDITIONS 28
4.1.3.1. TEMPERATURE AND PH 28
4.1.3.2. REDOX POTENTIAL AND pO_2 28
4.1.4. PROCESS SET-UP 30
4.2. INDUSTRIAL PROCESS DEVELOPMENT AND SCALE-UP: THE MULTICRITERIA APPROACH 36
4.2.1. MULTICRITERIA APPROACH APPLIED TO MICROBIAL HA PRODUCTION PROCESS 36
4.2.2. MULTICRITERIA APPROACH APPLIED TO SCALE-UP 41

5. CONCLUSION 42

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schematic representation of microbial HA production process and downstream extraction, purification and cross-linking steps. 9

Figure 2. Représentation schématique d'un dimère d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine, base de la molécule d'AH. 12

Figure 3. Electron micrograph of Streptococcus zooepidemicus cells obtained from the late exponential phase. Bar 1µm (Fong Chong et al., 2005). 14

Figure 4. Biosynthetic pathway from Streptococcus zooepidemicus showing the strong competition for substrates in HA, biomass and organic acids synthesis. 15

Figure 5. Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram-positives (Delcour et al., 1999). 17

Figure 6. Modèle de synthèse de l'AH chez Streptococcus zooepidemicus proposé par Tlapak-Simmons et al. (2004) revu par Hubbard et al., (2012) et retranscrit par Marcellin et al. (2014). 18

Figure 7. Schematic view of catabolism and anabolism in Streptococcus zooepidemicus, emphasizing HA and growth competition for substrates..... 20

Figure 8. Global approach applied to HA production optimization from the laboratory to the industrial scale. Highlighting of limiting (in green) factors situated at the interface between the two scales. 21

Figure 9. Important criteria for optimization of HA production at the laboratory scale. 22

Figure 10. Schéma synthétique de la répartition des flux de glucose entre la production de biomasse, la production d'AH et l'accumulation d'acide lactique chez Streptococcus zooepidemicus. 35

Figure 11. Scale-up principle and steps. 41

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparative studies for HA concentration, HA production rate and HA size after metabolic engineering assays. 24

Tableau 2. Comparative study related to process set-up advantages and drawbacks. 31

Tableau 3. Comparative overview based on cultivation mode. 33

Tableau 4. Comparative study of K_La and specific oxygen demand, on HA concentration and HA size during batch culture of Streptococcus zooepidemicus. 38

Projet de publication

Hyaluronic acid: applications, production processes and prospects for improvement

1. Introduction

From a chemical point of view, hyaluronic acid (HA) belongs to the large family of glycosaminoglycans or GAGs. Glycosominoglycans or mucopolysaccharides are high molecular weight (size) unbranched polysaccharides composed of disaccharides units (an amino sugar along with an uronic sugar). In contrast, some of the most common natural polysaccharides such as cellulose, starch or chitin are based on a single monosaccharide unit (De Angelis et al., 2012). HA differs from other glycosaminoglycans because it is non sulfated and weakly associated with a core protein (Kogan et al., 2006; Cregut and Rondags 2013).

Historically, this natural macromolecule, also called hyaluronan (Balazs et al., 1986), was first found in 1934 by Meyer and Palmer. Its name derives from its original discovery as an uronic acid-containing polymer and from the greek root: hyaloid (vitreous) related to its first extraction from vitreous body of eye (Meyer and Palmer 1934). Hyluronan is present in all vertebrates but is also found in the capsule of microbial pathogens such as *Streptococcus zooepidemicus*.

Due mainly to (i) its rheological properties, (ii) its hygroscopic power and (iii) its low immunogenic nature, HA is employed in a growing range of applications mainly in the medical and cosmetics domains, for its own performances or as a substitute or complement for the collagen use. As such, HA has became a key biopolymer and, as far as medical grade is concerned, around 10 tons are produced annually for an estimated value of 220 million US$, with a mean annual progression close to 2 % (Parker, 2011).

As a consequence, a great deal of effort is put into high grade HA industrial production, including both the initial HA sourcing and its downstream extraction and purification (Figure 1).

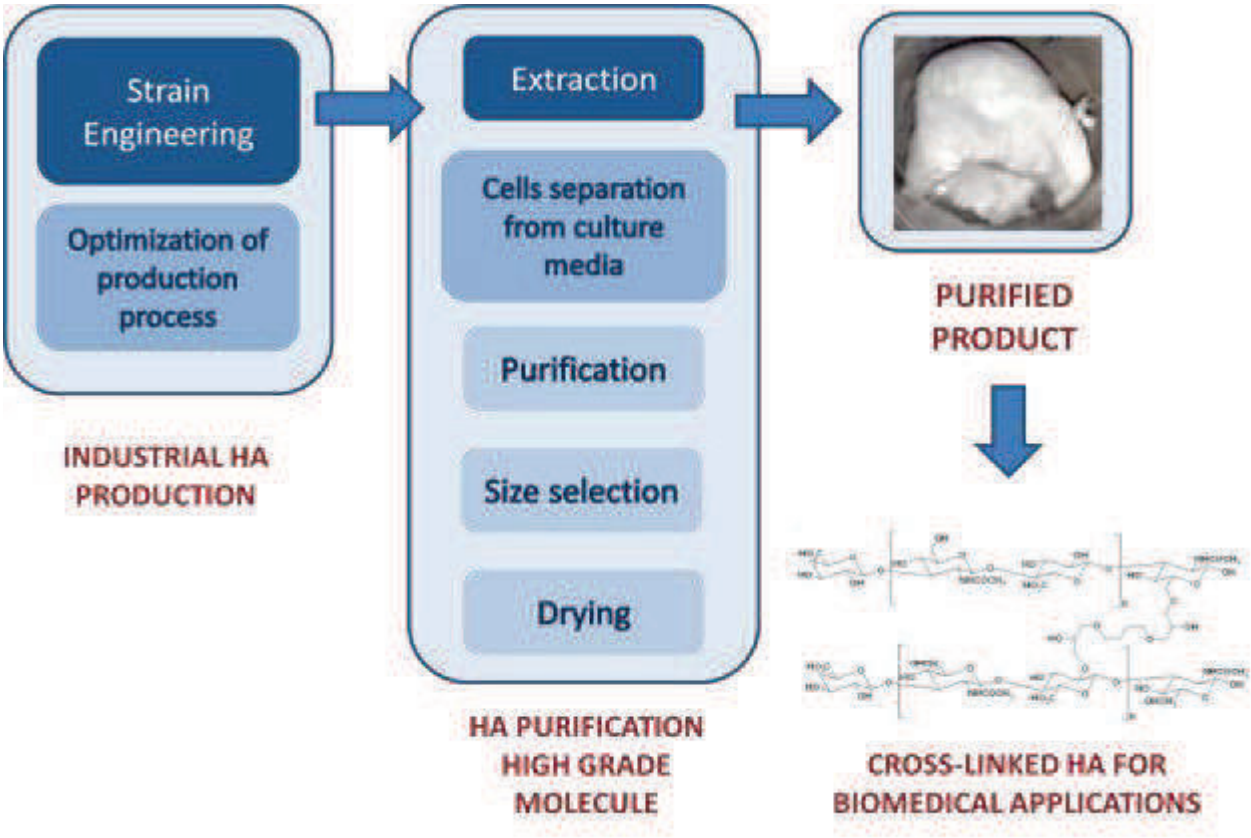


Figure 1. Schematic representation of microbial HA production process and downstream extraction, purification and cross-linking steps.

In this context, this review aims at describing the past, present and future HA sourcing strategies with their associated advantages, drawbacks and potential for improvement. This paper is thus set up to give a biotechnological engineering driven overview of the different available industrial HA production systems. This review will however deliberately exclude the extraction-purification and reticulation downstream steps which have been well documented otherwise (Smidsrød et al., 1967; Woolcock et al., 1974; Zhou et al., 2006; Sousa et al., 2009; Oueslati et al., 2014).

2. HA properties and applications

2.1. Properties

HA is a linear polymer composed of N-acetylglucosamine and glucuronic acid joined alternately by β (1-3) and β (1-4) glycoside bonds. HA length and molecular weight can vary depending on its origin. Considering that one disaccharide is in the order of 400 Da with

chain lengths up to 10,000 disaccharide repeats (Cowman and Matsuoka, 2005), HA molecular mass can reach 4 MDa. There is one carboxyl group per HA disaccharide unit. At pH above 5, HA becomes a poly-anionic chain with the lost of protons. This property can explain the formation of the secondary and tertiary structure of HA in aqueous solution (Goh LT, 1998) due to internal hydrogen bonds and interactions with the solvent.

The main and most widely recognized properties of HA concern its viscosity (rheological aspects), its hygroscopic power and its non-immunogenic particularity. Viscosity depends on its conformation, its molecular weight and its concentration in solution. Thus, at high concentrations and sizes, HA solution can be described as a non-Newtonian fluid. Chemical and physical environment may also be involved in the molecule stability and thus in HA viscosity (Price et al., 2007). For example, Lowry and Beavers (1994) reported that above 60 °C, the HA viscosity decreased with time. Pires et al. (2010) described various rheological aspects of HA starting with its purity (only 0.44 mg of proteins per gram of HA) and highlighted that storage (elasticity) and loss (viscosity) moduli increased with the HA concentration.

Rheological aspects are closely associated with the exceptional hygroscopic power of HA (water absorption up to a thousand times its weight) and explains that the polymer has many uses in a wide range of domains such as cosmetics and medicine (moisturizing property).

At last, as a relatively pure and non-immunogenic component of the extracellular matrix, HA offers cellular wound healing and regenerating possibilities. Indeed, HA appears in early phases of embryonic development as a water envelope around blastocyst and maintains the pluripotence of stem cells by limiting their differentiation as a natural element of their initial environment.

2.2. Applications

HA was first used commercially in 1942 as a substitute for egg white in bakery products (Necas et al., 2008). Since this day HA market considerably grew up. Indeed, because of its spectacular physiochemical properties, commercially available HA has found a lucrative market in medicinal and cosmetic applications with a worldwide market estimated to over $1 billion in 2011 (Liu et al., 2011). One of the first uses of HA was carried out during 1950s with its use in ophthalmic surgery to help the healing process and regeneration after

operations. Another important way of application concerns both dermatology and plastic surgery where HA is currently used to fill wrinkles, depressed scars or in a large range of moisturizing creams and lotions. For example, in 2011 there were around 100 different dermal fillers on the market and about half of them were based on HA (Liu et al., 2011). Due to the rising rate of osteoarthritis, one of the commonly medical applications of HA is the use of sodium hyaluronate for viscosupplementation. Nevertheless, it was not proven to generate significant benefit and has potentially severe adverse effects over the time (Rutjes et al., 2012). Other medical applications concern low molecular weight of HA and their implication in angiogenesis and cancers. As a tumor marker, HA can thus be exploited and may also be used to monitor the progression of the disease (Gritsenko et al., 2012). Finally regenerative properties of the HA are fully exploited to induce neovascularization and improve cardiac functions in the case of heart diseases (Abdalla et al., 2013). It was recently demonstrated that HA is secreted in damaged tissues and is involved in mesenchymal stem cells homing mediated by CD-44-HA interaction. (Bian et al., 2014). Moreover, it appears that HA hydrogels operate as a suitable support for stem cells propagation maintaining their undifferentiated state and their full differentiation capacity (Gerecht et al., 2007).

Résumé et compléments

L'AH est un polymère saccharidique naturel appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. C'est, avec le collagène, l'un des constituants essentiels de la matrice extracellulaire de notre derme et l'AH est, à ce titre, essentiel au maintien de la structure des couches de la peau. Le collagène confère aux tissus leur solidité et une forme de résistance mécanique tandis que l'AH, de par son pouvoir hygroscopique élevé, nourrit et hydrate en profondeur les interstices entre les fibres de collagène.

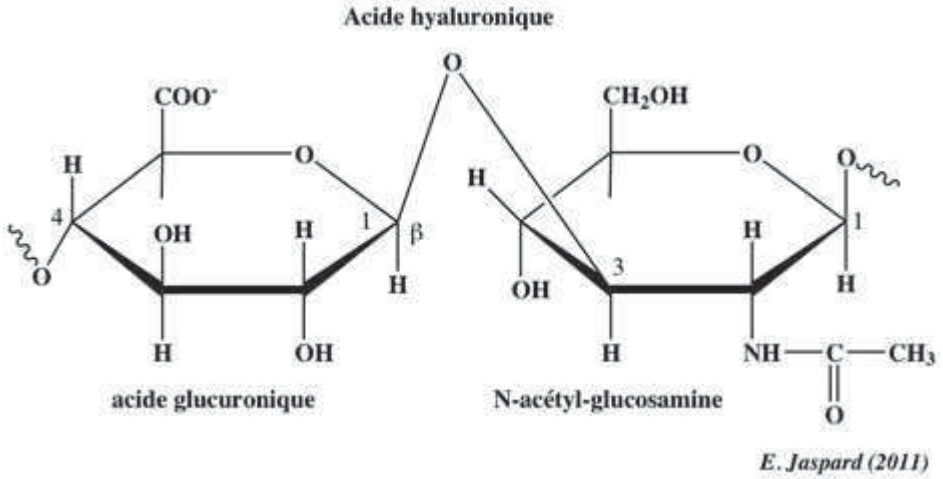


Figure 2. Représentation schématique d'un dimère d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine, base de la molécule d'AH.

La molécule d'AH est composée de dimères d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine liées alternativement par des liaisons glycosidiques β (1-3) et β (1-4) (Figure 2). Cette molécule est associée à une fraction protéique. Son poids moléculaire varie entre quelques dizaines de milliers et plusieurs millions de Daltons. Cette répartition de taille définit ses domaines d'application.

3. HA sourcing

3.1. Animal and mamalian HA

HA is widely found in several mammal species. Higher molecular weights are found naturally in synovial fluid for example whereas lower molecular weight plays a larger role in cell-to-cell communication. Fraser et al. (1997) mentioned a large range of distribution of HA using the rat as a mammalian model. More than 80 % of the HA is found in skin and skeleton. The remainder is found in lesser amounts in muscles and viscera. Concentrations above 1 g/L are found in rooster combs, human umbilical cords and synovial fluids and bovine nasal cartilage while concentrations comprised between 10 and 300 mg/L are located in human vitreous body and dermis, rabbit brain and muscle as well as human thoracic lymph. Trace concentrations are also found in human urine and serum (Fraser et al., 1997).

HA extraction from animal tissues is widely referenced in literature, but the HA from rooster combs is often chosen as a biopolymer of reference in comparative studies with a yield of 1 mg of dry HA per gram of frozen rooster comb and an average molecular weight of 1.2 MDa (Kang et al., 2010). Moreover Shiedline et al. (2004) demonstrated that impurities such as nucleic acids and proteins were in higher concentration in human umbilical cord and bovine vitreous than in rooster comb.

In the recent years, new extraction methods were developed to substitute traditional processes because regulations against the use of animal derived products were becoming progressively more stringent (O'Regan et al., 1994). Furthermore, in animal tissues, isolation and purification of quality HA are costly and time-consuming because of the polymer association with proteoglycan (Yamada and Kawazaki 2005). De Angelis et al. (1999) reported that algae are able too to produce HA and Volpi and Maccari (2003) developed a method to purify HA from the bivalve *Mytilus galloprovincialis*. Nevertheless these low performance methods are still very rare and the only feasible, practical and economical way to supplant animal HA production over the long-term appears to be "bacterial fermentation".

3.2. Microbial HA

3.2.1. Producing organisms

HA is naturally synthesized as an extracellular capsule by pathogenic Lancefield group A and C *streptococci*. The most commonly used bacteria for HA production is *Streptococcus zooepidemicus* (Johns et al., 1994; Fong Chong and Nielsen, 2003; Kim et al., 2006; Lai et al., 2012). Figure 3 depicts this bacterium surrounded by HA capsule.

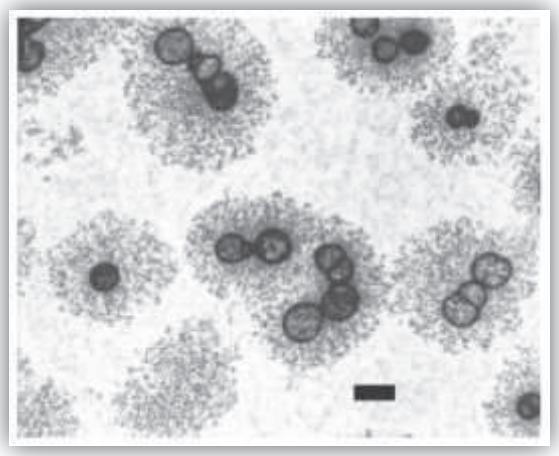


Figure 3. Electron micrograph of Streptococcus zooepidemicus cells obtained from the late exponential phase. Bar 1µm (Fong Chong et al., 2005).

Streptococcus zooepidemicus is a gram-positive and catalase negative known animal pathogen for horses, cows, and pigs and is an opportunistic pathogen in humans. It is also an emerging pathogen in canine species (Priestnall et al., 2010). This pathogenicity can be attributed to virulence factors such as β-hemolysis and particularly to HA capsule because it plays a role as host immune system protection.

3.2.2. HA functions in Streptococcus zooepidemicus

HA capsule ensures two essential functions in *Streptococcus zooepidemicus*: (i) protection against immune response or desiccation and (ii) migration and tissue invasion.

In 1979, Cleary and Larkin have shown that HA capsule allow aggregation in group A *streptococci* cells and act as a shield against reactive oxygen species (ROS). In 1991, Wessels et al., also demonstrated that the HA capsule protects this group of *streptococci* from phagocytosis and has thus an important role in virulence. Later, Wei et al., (2012) confirmed this defense mechanism in group C *streptococci* and underlined the fact that the *Streptococcus zooepidemicus* capsule can prevent complement-mediated opsonization and phagocytosis by cultured macrophages. Finally, Cywes and Wessels (2001) reported that capsule helps cells migration through the epithelial layers into tissues by ligation with the HA binding protein CD44. This process thus allows host tissue invasion during infection by *Streptococcus zooepidemicus*.

3.2.3. Biosynthetic pathway

Contrary to other glycosaminoglycans which are synthesized in Golgi, HA is polymerized on the cytoplasmatic side of the plasma membrane of *Streptococcus zooepidemicus*. The UDP-N-acetyl-glucosamine and the UDP-glucuronic acid subunits of HA respectively derived from fructose-6-phosphate and glucose-6-phosphate (Figure 4). This has been demonstrated by carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance studies in *Streptococcus zooepidemicus* following the incorporation of a [1-^{13}C]-D-glucose into the [1-^{13}C]-D-glucuronic acid units and [1-^{13}C]-N-[$^{13}CH_3$] acetamido-glucosamine units of HA (Matsubara et al., 1991).

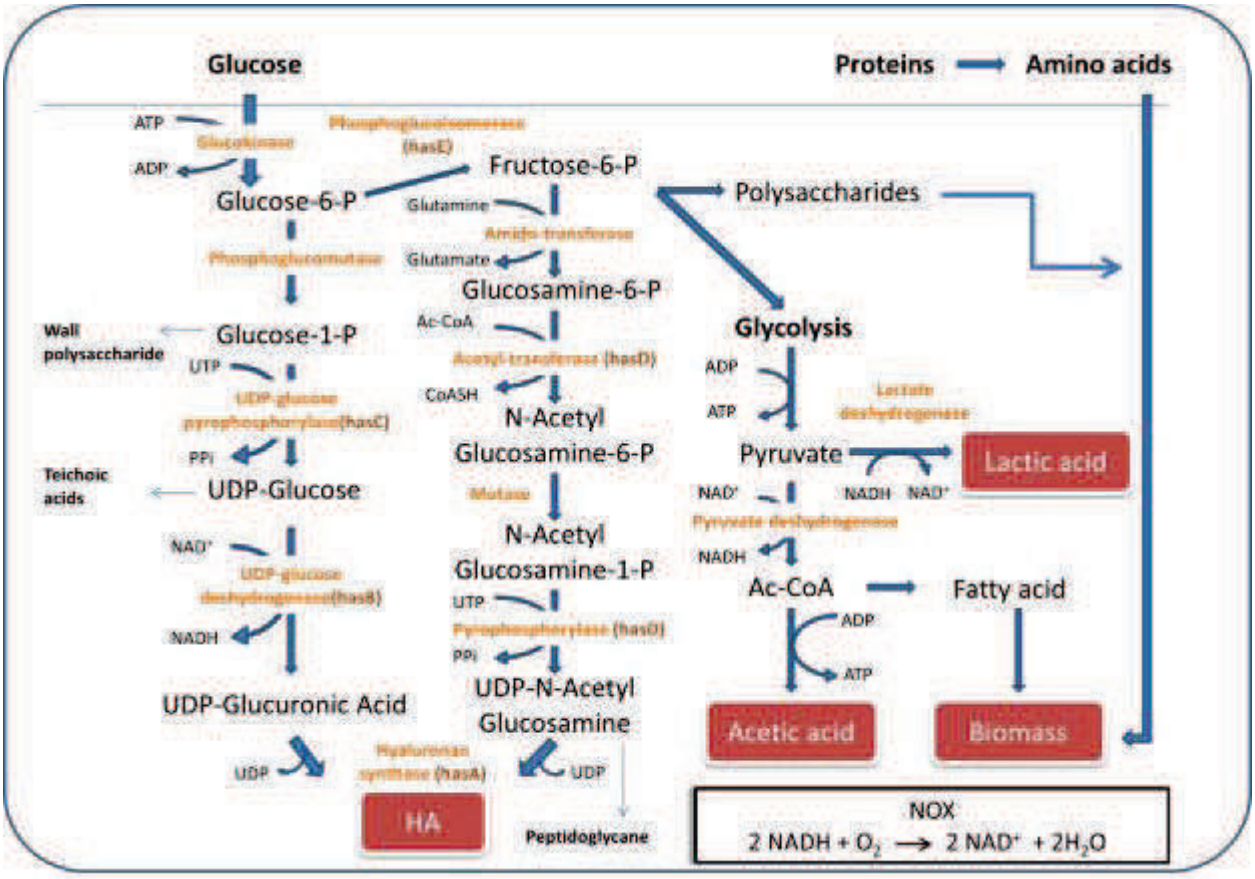


Figure 4. Biosynthetic pathway from Streptococcus zooepidemicus *showing the strong competition for substrates in HA, biomass and organic acids synthesis.*

Following this metabolic cascade, HA units are finally assembled by a membrane-bound enzyme called hyaluronan synthase (HA synthase). This enzyme is encoded by the *has*A gene which belongs to the *has* operon with four other genes involved in HA synthesis: *has*B (UDP-glucose deshydrogenase), *has*C (UDP-glucose pyrophosphorylase), *has*D (acetyl-transferase and pyrophosphorylase) and *has*E which encodes for the phosphoglucoisomerase

(Prasad et al., 2012). HA synthase from *Streptococcus* is a glycosyltransferase belonging to class I of HA synthase. The main activity of the HA synthase is, therefore, to assemble and add new dimers to the reducing end of the neoformed polysaccharides chain (Weigel and De Angelis, 2007) but subsequently, HA synthase has also an important role in the transfer of new synthesized HA out of the cell (De Angelis et al., 1999). Although this process is not yet described to our knowledge for *Streptococcus zooepidemicus* cells, Hubbard et al. (2012) described a spatially coupled action of HA synthase on elongation and translocation of HA across the membrane in a *Streptococcus equisimilis* strain.

3.2.4. HA degradation

As previously mentioned, the stability of the resulting HA will depend on many environmental parameters such as pH and temperature. This stability was described as closely associated with hyaluronidase production (Lenormand et al., 2011). Indeed, *Streptococcus zooepidemicus* produces concomitantly the HA and the enzyme responsible for its degradation: the hyaluronidase. This enzyme corresponds to a large family of enzymes whose conventional designation for bacterial hyaluronidase is hyaluronate lyase (El Safory et al., 2010). Even if it is well understood that hyaluronate lyase binds randomly the polysaccharides and cleaves it on β-1,4 glycosidic bonds, the process of degradation of the enzyme remains uncertain. From the 3D structure studies Jedrzejas et al., (2002) suggested that degradation starts from the reducing end to finish on the non-reducing end of the polymer whereas a counterclockwise degradation was proposed by Baker and Pritchard in 2000 based on studies of the degradation products.

Streptococcal hyaluronidases cover an essential function during infection. Several hypotheses are discussed in literature but it appears that HA and hyaluronidases are probably consecutively produced during cell growth. HA capsule is first produced to facilitate cell migration and then hyaluronidases are produced in order to use HA as a carbon, energy and nitrogen source during late phase of infection. Marion et al., (2012) demonstrated that HA capsule is actually utilized by *Streptococcus pneumoniae* during airway colonization and this suggests that *Streptococcus* strains are probably able to metabolize in vivo other carbohydrates sources via hyaluronidase activity.

Résumé et compléments

Pendant plusieurs décennies, la majeure partie de la production d'acide hyaluronique à l'échelle industrielle se faisait par extraction à partir de crêtes de coq (source privilégiée pour son contenu élevé en acide hyaluronique ainsi que le coût d'obtention de la matière première relativement faible). Néanmoins, le rendement limité de la méthode d'extraction et l'origine animale du produit (contaminations protéiques, vecteur de pathogénicité…) font que la production par voie microbienne est peu à peu favorisée.

Les souches les plus utilisées pour la production d'AH sont des streptocoques des groupes A et C de la classification sérologique de Lancefield. Plus particulièrement, la bactérie β-hémolytique *Streptococcus zooepidemicus* est un des candidats privilégiés. Ces coques, associées en paires ou longues chaînes (jusqu'à une cinquantaine de cellules), produisent dans des conditions physiologiques adéquates l'AH du côté interne de la membrane plasmique (Figure 5). L'AH synthétase responsable de l'assemblage des dimères de N-acétyl-glucosamine et d'acide glucuronique assure ensuite la translocation de la chaîne produite au niveau de la capsule exocellulaire.

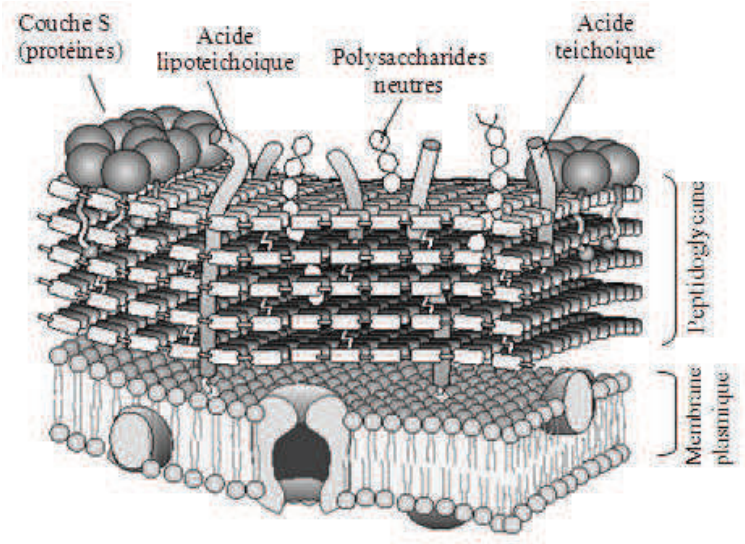


Figure 5. Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram-positives (Delcour et al., 1999).

Document confidentiel

Marcellin et al. (2014) ont à ce titre, proposé un modèle schématique de la synthèse de l'AH basé sur les travaux de Tlapak-Simmons et al. (2004) et Hubbard et al. (2012). La Figure 6A symbolise le mécanisme de synthèse de l'AH par l'AH synthétase qui va alternativement associer des unités saccharidiques d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire pour ensuite allonger au fur et à mesure la chaîne d'AH à travers un pore transmembranaire (translocation). Les Figure 6-B et C mettent en avant le fait que la taille moléculaire de l'AH finalement produit sera largement dépendante de la disponibilité et de l'équilibre entre les précurseurs d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine.

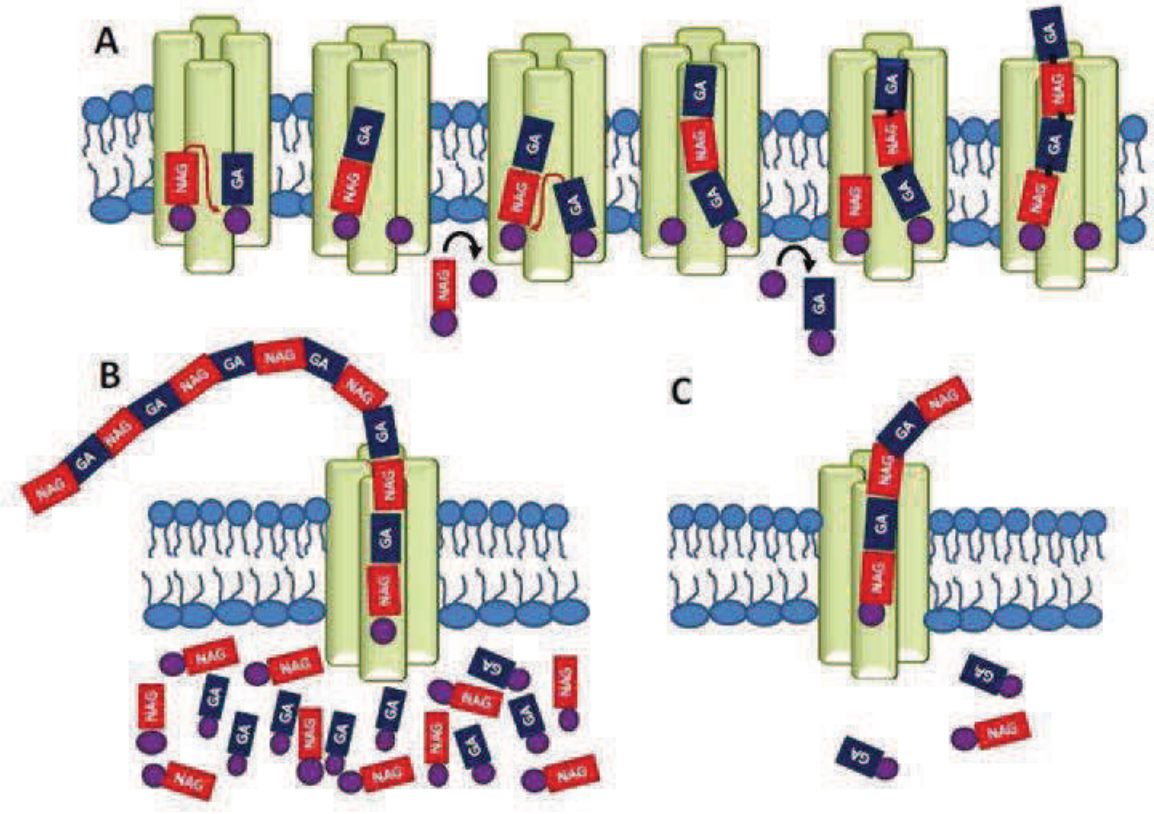


Figure 6. Modèle de synthèse de l'AH chez Streptococcus zooepidemicus *proposé par Tlapak-Simmons et al. (2004) revu par Hubbard et al., (2012) et retranscrit par Marcellin et al. (2014).*

Au-delà de son intérêt industriel en tant qu'exopolysaccharide à fort pouvoir hygroscopique, l'AH présente des fonctions anti-inflammatoires qui font de cette molécule un facteur de virulence chez *Streptococcus zooepidemicus*. En effet, les bactéries encapsulées sont des pathogènes antiphagocytaires reconnus qui restent sensibles à la réponse immunitaire acquise à médiation humorale (lymphocytes B) mais pas ou peu à la réponse immune innée

(macrophages, système du complément). Des individus immunodéprimés présentant une déficience en lymphocytes B auront donc une importante susceptibilité d'infection.

La particularité de *Streptococcus zooepidemicus* tient du fait qu'en plus de la production d'AH, cette bactérie produit l'enzyme responsable de sa dégradation : la hyaluronidase. Cette enzyme est aussi un facteur de virulence exprimé chez *Streptococcus zooepidemicus* dans les phases tardives de l'infection dans le but de métaboliser l'AH produit à titre de source carbonée, azotée et énergétique.

4. Microbial HA production and quality optimization

Strains of *Streptococcus zooepidemicus* naturally found in environment are undeniably HA producers. Even if scattered reports proposed optimization approaches based on environmental strains resulting in low production rates (Patil et al., 2009), the majority of optimization studies were carried out with engineered strains including environmental strains, strains generally recognized as safe (GRAS) and strains which can be easily handled such as *Escherichia coli*.

From the strain selection and the formulation of the culture medium to the selection of the suitable culture mode, different ways to optimize production and quality of the HA polymer were broadly discussed in literature (Kim et al., 1996; Liu et al., 2008; Duan et al., 2009; Vazquez et al., 2009; Im et al., 2009; Chen et al., 2012). It is agreed that there is a strong competition for substrates between HA production, cell growth and metabolic products synthesis (Figure 7). Regarding this, improvement strategies aim to increase the final product concentration and HA molecular weight, but also to reduce the production of unwanted metabolites or the co-expression of enzymes involved in the degradation of the molecule of interest.

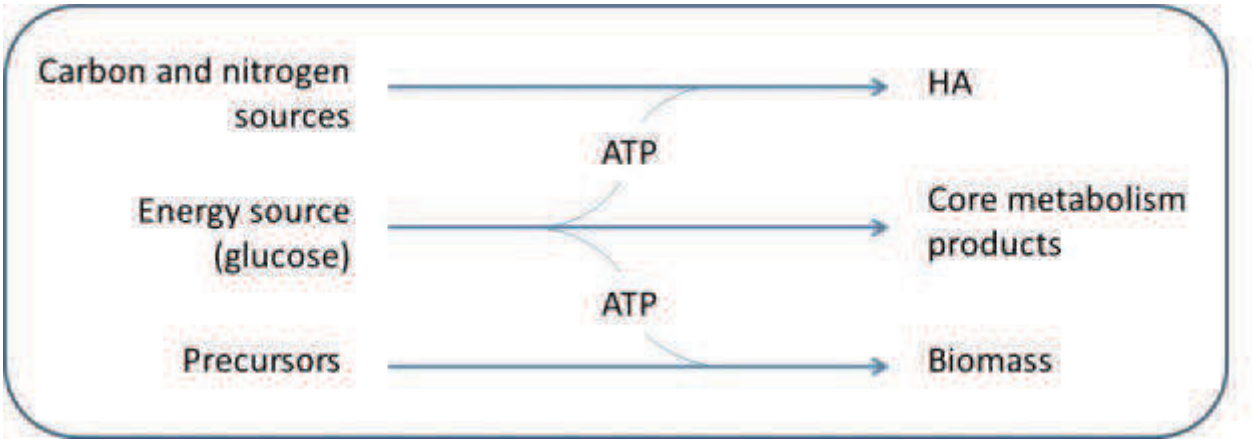


Figure 7. Schematic view of catabolism and anabolism in Streptococcus zooepidemicus*, emphasizing HA and growth competition for substrates.*

The most common methodology suggests to consider a whole range of factors separately (one factor at a time method) in order to characterize their effects on the studied response but multifactorial approach constitutes a more refined methodological tool and considers cross effect between series of factors. In fact, the factors which positively affect HA production or HA quality could be the culture medium, physico-chemical parameters or the culture mode (Figure 8).

As shown in Figure 8, the global approach for HA production can be split in two fundamental steps. The first one consists in optimization at the laboratory scale experiments. The second one consists in scale-up and industrial process development. Reactor extrapolation requires the proper acquisition of kinetic data on small-scale reactor in order to define the operating conditions of the industrial process allowing achieving the maximum system efficiency at the minimum energy expenditure and thus the minimum cost (mass and heat transfers concerns). This implies to consider limiting factors in order to define the layout, sizing, operating conditions and driving devices. These factors concern the strain (stability, safety), the medium (metabolic competition, variation in the quality of the raw material), the physicochemical culture conditions and the operating conditions of the process (feasibility of the extrapolation, viscosity, shear stress). The steps of HA production process development are discussed below.

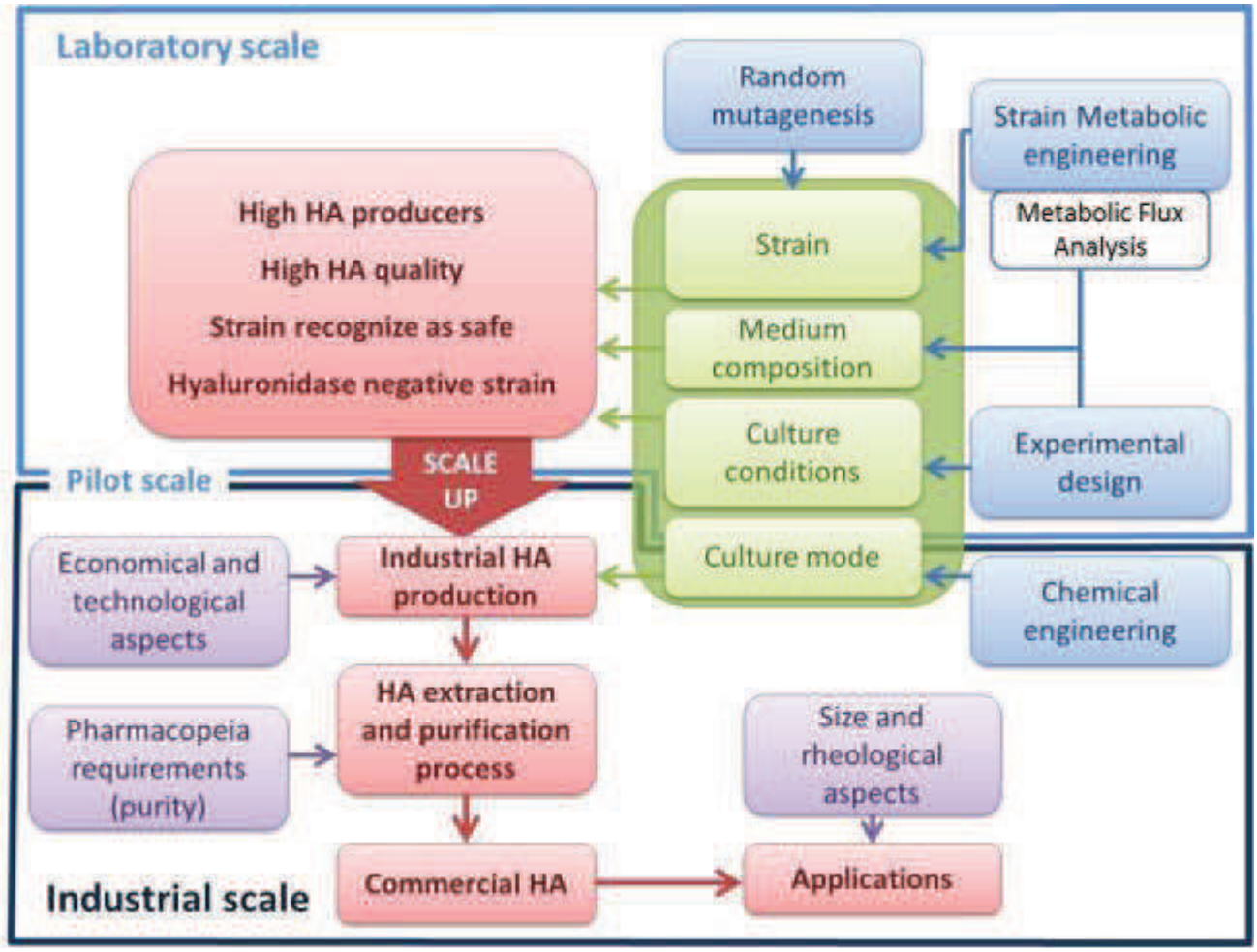


Figure 8. Global approach applied to HA production optimization from the laboratory to the industrial scale. Highlighting of limiting (in green) factors situated at the interface between the two scales.

4.1. Lab scale process development

The *Streptococcus zooepidemicus* lactic acid bacterium has a natural tendency to produce primarily biomass and associated products of central metabolism such as lactic and acetic acid. Improved HA yields necessarily requires an adjustment in parameters such as the nature and concentration of the different types of substrates, the culture conditions but also the culture mode, in order to redirect the substrates from the primary metabolism to the production of HA (Figure 9).

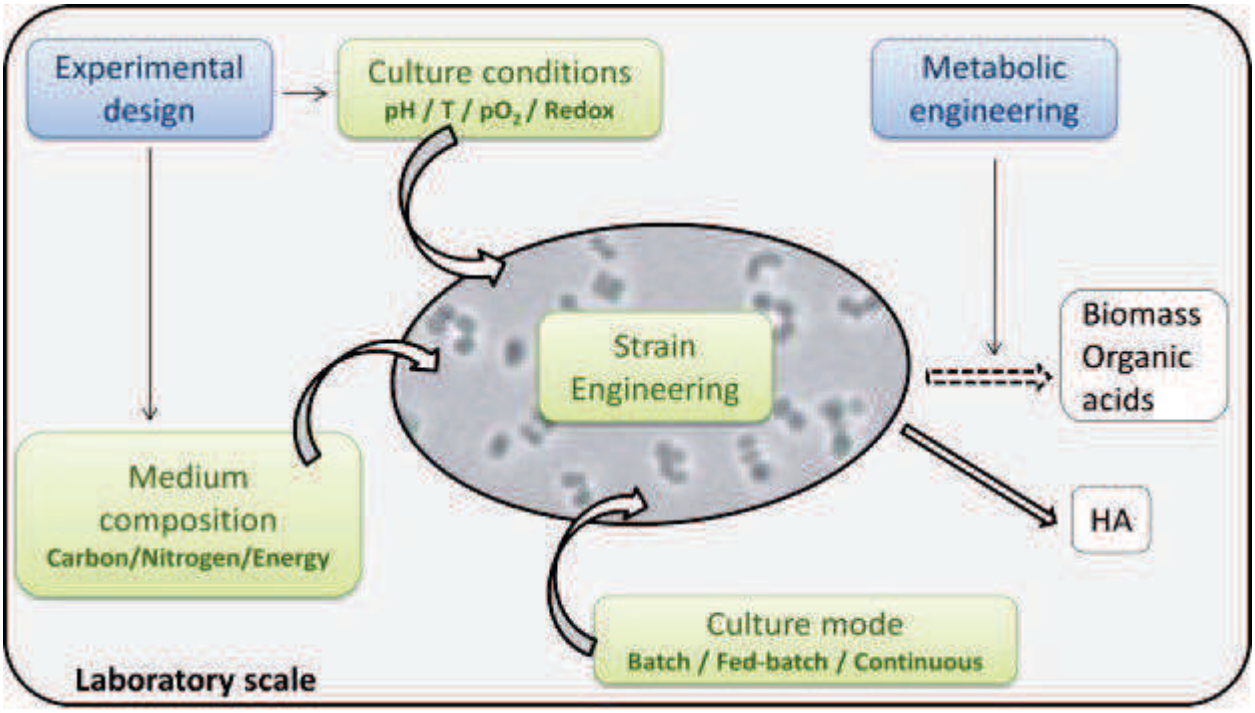


Figure 9. Important criteria for optimization of HA production at the laboratory scale.

4.1.1. Strain(s) engineering

Two wide categories of methodologies are used in order to delete specific and unwanted characteristics of environmental *Streptococcus zooepidemicus* strains (hemolysis, hyaluronidase production) and to improve HA production rates and molecular weight in both environmental and engineered strains such as GRAS or *Escherichia coli* strains. Random mutagenesis is performed almost entirely on environmental pathogenic strains which are potential producers due to their location on infection sites whereas metabolic engineering can be applied either on *Streptococcus zooepidemicus* or on other microbial species.

4.1.1.1. Random mutagenesis

Random mutagenesis is the most common and practical method for the genetic modification of strains. The random nature of this method induces modifications in the genome without the possibility to locate them and strain stability after mutagenesis is not guaranteed. Nevertheless, it remains the preferential strain modification method used for industrial purposes. Kim et al. (1996) opted for a chemical mutagenesis with *N*-methyl-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG). The resulting and selected mutants had non-hemolytic, hyaluronidase-negative, and highly viscous characteristics. With no additional optimization, a

HA production of 3.65 g/L and a HA molecular weight of 2.9 MDa were reached. Using the same selection criteria, Chen et al. (2012) practiced a repeated screening of mutants arising from physical mutagenesis by ultraviolet ray combined with ^{60}Co-γ ray but only weak concentrations were obtained (174.76 mg/L).

4.1.1.2. Metabolic engineering

Metabolic engineering is an alternative to random mutagenesis and probably the most effective and stable approach. It can be directly achieved on environmental strains to overexpress or delete targeted genes or it can be applied on other more technologically convenient species by gene transfer. As far as environmental strains are concerned, the whole genome of *Streptococcus zooepidemicus* has been recently sequenced (Ma et al., 2011). This will certainly contribute to many developments in this field.

Due to the high number of genes involved in HA synthesis pathway, genetic tools have been used to countless creative strategies to optimize HA production and molecular weight. Many studies focused on overexpression or deletion of specific genes to increase HA molecular weight (Table1). The hasA gene, encoding the HA synthase, has been shown to be the only self-sufficient gene required in the synthesis of a functional enzyme in *Streptococcus zooepidemicus* and was logically the subject of many studies (Sun et al., 2013). The overexpression of the UDP-glucuronic acid genes (hasC and hasB) synthesis also reduced molecular weight in *Streptococcus zooepidemicus* from 2.5 MDa (control) to 2 MDa (hasC) and 2.1 MDa (hasB). In parallel, co-overexpression of genes involved in UDP-N-acetyl glucosamine biosynthesis (hasED) increased molecular weight from 2.5 MDa (control) to 3.4 MDa (Chen et al., 2009).

The construction of highly productive stable and safe industrial strains is also an alternative. Indeed, organisms like *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis* represent a new generation of producers (Chien and Lee, 2007; Prasad et al., 2012; Jia et al., 2013). These species offer many assets: (i) they are generally considered as safe strains (GRAS), (ii) cell cultures are easy to implement and (iii) as gram positive microorganisms, they have all necessary enzymatic activity excluding HA synthase (Schiraldi et al., 2008). The use of GRAS organisms is thus more and more supported and the metabolic engineering of uncommon other lactic acid bacteria such as *Streptococcus thermophilus* can be envisaged (Izawa et al., 2009 and 2011).

Finally, it was established that transfer of HA synthase from *Streptococcus equisimilis* results in HA production close to 3.6 MDa in an *E. coli* transformed strains (Kumari et al., 2006). These various studies concerning metabolic engineering are detailed in "Tableau 1".

Tableau 1. Comparative studies for HA concentration, HA production rate and HA size after metabolic engineering assays.

Strain	Origin	Targeted gene(s)	Details	[HA] (g/L)	HA size (MDa)	Source
Streptococcus zooepidemicus	ATCC35246	has A	Overexpression	[HA] ↗	2.5 to 2.1	Chen et al., 2009
Streptococcus zooepidemicus	ATCC35246	has B and has C	Overexpression	[HA] ↘	2.5 to 2.1	Chen et al., 2009
Streptococcus zooepidemicus	ATCC35246	has E and has D	Co-overexpression	[HA] ↘	2.5 to 3.4	Chen et al., 2009
Bacillus subtilis	BGSC 1A751	has A	Expressed from *S. zooepidemicus*	0 to 0.46	-	Chien and Lee, 2007
Bacillus subtilis	BGSC 1A751	has A and has B	Co-expressed from *S. zooepidemicus*	0.46 to 0.84	-	Chien and Lee, 2007
Bacillus subtilis	BGSC 1A751	has A and tau D	Co-expressed from *S. zooepidemicus and B.subtilis* respectively	0.84 to 1.14	-	Chien and Lee, 2007
Bacillus subtilis	BGSC 1A1	HA synthase and tau D/gta B	Co-expressed from *P. multocida* and *B. subtilis* respectively	3.1 to 6.8	0.008 to 5.4	Jia et al., 2013
Lactococcus lactis	ATCC19345	has A and has B	Co-expressed from *S. zooepidemicus*	0 to 0.65	-	Chien and Lee, 2007
Lactococcus lactis	NZ9000	has A and has B	Co-expressed from *S. zooepidemicus*	0 to 0.123	-	Prasad et al., 2012
Lactococcus lactis	NZ9000	has A,B and C	Co-expressed from *S. zooepidemicus*	0 to 0.43	-	Prasad et al., 2012

Lactococcus lactis	NZ9000	has A,B and D	Co-expressed from *S. zooepidemicus*	0 to 0.595	-	Prasad et al., 2012
Streptococcus thermophilus	YIT2084	has A and has B	Co-expressed	0.23 to 1.2	Stable at 1	Izawa et al., 2011
E. coli	SURE competent cell (Stratagene)	has A	Expressed from *S. equisimilis*	-	3.6	Kumari et al., 2006

Therefore, strain development and selection represents an important step in bioprocesses and as in this case in HA microbial process implementation, in order to obtain strains with adequate enzymatic and metabolic capabilities and efficient strains in defined environmental culture conditions and culture medium. Actually, the strain selection, the conditions of implementation and the culture medium formulation are fundamental and related steps in bioprocesses implementation and optimization. We will deal here primarily with *Streptococcus zooepidemicus* concerning studies.

4.1.2. Culture medium optimization

Organisms such as *Streptococcus zooepidemicus* usually grow in semi-defined culture media containing carbohydrates as sources of carbon and of energy, yeast extract and peptone as sources of nitrogen and carbon, and nutrients including amino acids (Armstrong et al., 1997), minerals (Pires et al., 2010), nucleotides, and vitamins. Culture media have to reproduce as closely as possible the environmental conditions encountered by cells *in vivo* where they efficiently produce HA. They must be both vectors of nutrients, allow cell division and help to maintain the physico-chemical conditions such as pH. There are two linked strategies to enhance HA concentration and molecular weights: upstream synthesis improvement and downstream degradation prevention.

The understanding and control of the composition of culture media is a key factor in order to optimize, qualitatively and quantitatively, the production of HA by modulating of upstream metabolic fluxes in the cell. In order to optimize HA production and HA molecular weight, two general approaches have emerged: a global nutritional approach and one considering metabolic fluxes.

The first approach considers the requirements and limitations feeding characterizing the cells in terms of carbon, energy, nitrogen and minerals. For example, it was pointed out that suitable carbon/nitrogen ratio allows enhancing HA synthesis (Lai et al., 2011). Moreover, the nature of carbon and nitrogen sources is also a key element for HA production. The predominant carbon and nitrogen sources are respectively glucose and a combination of yeast extract and peptone. Im et al. (2009) studied the influence of other sources such as minerals ions or organic acids on the production of HA in Erlenmeyer's flask culture in a "one factor at a time" experiment. The highest HA productivity was obtained with glucose as carbon and energy source (1.58 g/L) and yeast extract or peptone as nitrogen sources (1.64 and 1.65 g/L). These results were confirmed by Chen et al. (2012). It was shown that the maximal HA production depends on the choice of the suitable carbon, energy and nitrogen sources, but also on their initial concentrations. Pires et al. (2010) demonstrated that there is a significant effect of initial glucose concentration on biomass or HA outputs if cultures are carried out in a bioreactor. The highest HA concentrations (1.21 g/L) were reached with a 25 g/L initial glucose concentration (Pires et al., 2010) while above 40 g/L, the cell growth was inhibited (Don et al., 2010). Jagannath and Ramachandran (2010) observed that increasing the concentration of nitrogen source allows the increase of the specific growth rate and consequently the decrease of HA production rate. These assessments focus on bacterial requirements and consider HA simply as a product from the bacterial metabolism. Taking into account that HA plays a role as virulence factor, the effects of nutritional limitations should be considered differently. Indeed, many virulence genes in pathogenic bacteria are regulated by environmental and nutritional signals such as an iron limitation to stimulate hemolytic activity and consequently HA production (Somerville and Proctor, 2009).

A second strategy, based on metabolic fluxes, can be thus carried on in order to offset the pronounced competition between HA and biomass production in *Streptococcus zooepidemicus*. A lysozyme addition in medium can increase HA concentration (Kim et al., 1996). This enzyme specifically hydrolyzes the peptidoglycan of the major wall component of gram positive bacteria releasing HA precursor. A supplementation of the medium with pyruvate, tryptophan or glutamine can redirect the carbon flux towards HA biosynthesis pathway by partially inhibiting glycolytic pathway (Shah et al., 2013). In contrast, Jagannath and Ramachandran (2010) proposed to increase carbon source concentration to saturate glycolytic enzymes. Glucose derivatives in excess turned to the synthesis of HA leading to an increase in concentration (29 %) and in the molecular weight (8 %). Finally, by increasing

cell membrane permeability, a phosphatidylcholine addition can also improve HA concentration and sizes by 17.4 % and 67.1 % respectively as compared to a control (Sun et al., 2011).

The control of the culture medium composition is thus an efficient way to optimize HA production. Another downstream strategy of medium supplementation, which remains imprecise, is to prevent HA from degradation. Hyaluronate lyases or bacterial hyaluronidases have been extensively studied and were first isolated and characterized in group C *Streptococci* in 1956 by Mac Lennan who observed that hyaluronidase activity destroyed capsular HA. The excretion of the enzyme responsible for HA degradation in the culture medium thus represents an actual and critical limitation to the HA production in *Streptococcus zooepidemicus*. A simple way to inhibit bacterial hyaluronidase activity in microbial HA production process is strains mutagenesis (Kim et al., 1996). But the possibility of reversion is significant and bacteriophage of group C *Streptococci* can also produce hyaluronidase to penetrate across the HA capsule. This viral enzyme was fully studied (Benchetrit et al., 1977; Hynes et al., 1989; Hynes et al., 1995; Baker et al., 2002) and it was demonstrated that hyaluronidase from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage efficiently degrades HA (El Safory et al., 2011). In order to definitively inhibit bacterial and bacteriophage hyaluronidase activities, few studies focus on medium supplementation. The hyaluronate lyase activity from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage can be efficiently inhibited by various metal ions at a concentration of 20 mM (El Safory et al., 2011). Low inhibition are observed with Ca^{2+} and Mg^{2+}, a strong ones with Zn^{2+} and total ones with Cu^{2+}, Ni^{2+} and Co^{2+}. Activity of bacterial hyaluronidase from *Streptococcus* can be also inhibit by metal ions such as Fe^{3+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ag^{+}, Ni^{2+}, Sr^{2+}, and Cu^{2+} at 10 mM concentration (Sahoo et al., 2007) but these studies did not consider consequences on HA production during "fermentation". Lastly, acylated derivatives from the ascorbic acid represent also an interesting option in order to inhibit bacterial hyaluronidase activity (Spickenreither et al., 2006). It was demonstrated that the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) decreased with the length of the aliphatic chain with an IC_{50} value of 0.9 µM for the more efficient 6-O-octadecanoate derivative.

4.1.3. Physicochemical cultivation conditions

Physicochemical conditions applied to bacterial cultures represent, in most cases, very important variables for the successful implementation of a process. The culture conditions include easily controlled and well studied parameters such as pH, temperature and other controlled or only monitored parameters such as oxygen partial pressure or the redox potential whose impact on growth and HA production in *Streptococcus zooepidemicus* is less mastered.

4.1.3.1. Temperature and pH

According to a large majority of studies, pH and temperature are usually set at 7.0 and 37 °C respectively (Armstrong et al., 1997; Im et al., 2009). Kim et al. (2006) reported that the maximum growth rate, HA productivity (4.8 g/L) and HA molecular weight (2.2 Mda) were obtained at a pH of 7 and observed a decrease in the molecular weight and production of HA at pH's above 8. These authors also studied the influence of temperature for values comprised between 29 and 38 °C. The maximum HA concentration (5.1 g/L) was reached at 35 °C. Above 38 °C, the HA molecular weight significantly decreases. Below 35 °C, a maximal molecular weight of 2.9 MDa is reached. Applying a non-optimal temperature for growth could explain that HA production and molecular weight are metabolically privileged. That possibility was investigated by Liu et al. (2008) in a dynamic approach. An alkaline stress strategy was applied in order to redirect carbon flux from biomass and lactic acid to HA production. Keeping pH value at 7.0 during first six hours of culture and then switching between 8.5 and 7.0 every hour until the end of fermentation (16 h) led to an increase in HA production from 5 g/L to 6.5 g/L. This result goes together with an increase in NADH oxydase activity which suggests that HA production could also strongly depends on redox environment.

4.1.3.2. Redox potential and pO_2

In comparison with controlled parameters such as pH and temperature, the role of oxygen partial pressure and redox potential on HA production remains poorly defined in literature.

Because of the aerotolerance and fermentative metabolism of *Streptococcus zooepidemicus*, oxygen level and correlatively redox potential play an important role in growth and HA

production. This aerotolerance is closely associated with (i) the production of the superoxide dismutase which moderates the undesirable effects of oxygen free radicals and (ii) with NADH oxydase activity which reduce oxygen to water in order to regenerate NAD^+ (Fong Chong and Nielsen, 2003). Figure 4 shown that the coenzyme NAD plays an important role in *Streptococcus zooepidemicus* metabolism. NAD level in both reduced and oxidized forms play an important role in organic acid formation whereas its oxidized form accumulation can affect HA precursor production increasing UDP-glucose deshydrogenase activity.

Increasing in energy status of the cell and NADH oxydase activity was observed using maltose instead of glucose as substrate under equal culture conditions including oxygenation level. Fong Chong and Nielsen (2003) concluded that these modifications interfere on acetate and lactate levels but not in HA production. In comparison, Sun et al., 2011 demonstrated that a phosphatidylcholine addition in culture medium resulted in higher energy regeneration level in cell with a positive effect on UDP-N-Acetyl Glucosamine HA precursor synthesis and thus HA size and concentration. Moreover it was established that expression of the polyhydroxybutyrate synthase gene from *Ralstonia eutropha* in *Streptococcus zooepidemicus* recombinant strain allows enhancing HA production (from 5.5 to 7.5 g/L) at the expense of lactic acid formation (from 65 to 40 g/L) by decreasing the flux to the original NADH re-oxidation lactic acid pathway and increasing NAD regeneration via NADH oxidase pathway to create an oxidative environment (Zhang et al., 2006).

The oxygen involved in NADH oxidase activity has thus an important but ambiguous role in HA synthesis. Regarding the HA production, functional concentration and molecular weight are more important in the presence of O_2 than under anaerobic conditions (Kim et al., 1996; Armstrong et al., 1997; Fong Chong and Nielsen 2003). Anaerobic conditions resulted in repression of has gene expression and HA synthase activity (Duan et al., 2009). In aerobic conditions, glucose consumption and growth rate are increased and acetate is formed in larger quantities. This accumulation can increase energetic yields, and consequently HA yields, because the acetic acid formation can generate more ATP than lactic acid formation (Duan et al., 2009). Moreover, acetyl-CoA flux diverging from the central carbon metabolism can be increased and directed to HA production (Wu et al., 2009). As an example, this could be explained by acetic acid re-use via the glyoxylate pathway observed in *Streptococcus zooepidemicus* metabolism.

Thus, many studies consider influence of oxygen on the production of HA usually taking into account dissolved oxygen (DO), agitation speed and considering infrequently oxygen mass transfer (K_La). Increase mixing (stirring speed from 300 to 600 rpm) with a constant aeration rate of 0.3 vvm can improve HA yields, but not the production rate (Johns et al., 1994). A critical saturation level, set at 5 % DO as a critical point, can stimulate HA synthesis whereas an increase in agitation does not impact the HA production rates although it boosts oxygen transfer (Huang et al., 2006). The addition of 1 to 5 % (v/v) of n-dodecane (Liu et al., 2009a; Lai et al., 2012) or 3 % (v/v) of perfluorodecalin (Liu et al., 2009b) allows increasing both K_La and dissolved oxygen which lead to an increase in HA production. For Duan et al. (2008) high dissolved oxygen level allows increasing HA molecular weight with a maximum of 2.19 MDa at 50 % DO.

However, a strong oxygenation and a high shear stress can also result in the formation of reactive oxygen species (ROS) (Zhang et al., 2010) which could affect energy, biomass yields and by-products from sugar metabolism of lactic acid bacteria (Condon et al., 1987). In addition, a depolymerization of HA by these ROS was clearly established (Jahn et al., 1999; Liu et al., 2009c; De Macedo et al., 2012). A control of the aeration and agitation during the HA production phase could be favorable to the polymer synthesis. Liu et al. (2009c) proposed a two step strategy, with a 10 % DO applied during exponential cell growth (0-8 h) and a switch to 5 % during HA production (8-20 h), which successfully increased the HA synthesis.

4.1.4. Process set-up

The previously treated data have shown that specific stable and variable physicochemical conditions must be controlled. Considering that the system of HA production is a dynamic model explains the need to work on an appropriate cultivation mode. In chemical engineering, three major classes of cultivation modes, defined as ideals, are described and widely used. There usually are the closed reactor or batch reactor, the fed-batch reactor and finally the continuous reactor. These systems are associated with various assumptions as a homogeneous mix at the molecular scale and a homogeneous temperature in the reactor, assumptions which are far from evident with highly viscous cultures. Moreover, considering batch and continuous reactors, volume is considered as constant. These modes of culture were extensively studied in the literature. General advantages and drawbacks are summarized in “Tableau 2”.

Tableau 2. Comparative study related to process set-up advantages and drawbacks.

Culture mode	Advantages	Drawbacks
BATCH	- By definition adapted to batch production - Easy to implement - Possibility to change operating conditions during process	- Possibility of inhibition due to high initial substrate or final product concentrations or nutrient limitation - Lag time between successive experiments (reactor preparation, costs)
FED-BATCH	- By definition adapted to batch production - Suitable for bi-phasic phenomena studies (growth/HA production) - Ability to extent efficient production phase - Possibility of medium adjustments during culture	- Requires excellent inflows control - Lag time between successive experiments
CONTINUOUS	- Cell physiological and technological stability and minor variations in product quality - Reduce protein contamination (Leonard et al., 1998)	- Requires excellent flow control - Large batches (industrial risk)

Batch production

Due to its ease of implementation, industrial HA production by batch fermentation remains the preferential alternative because of (i) practicality of implementation and (ii) because HA productivity in batch culture was described as higher than in the fed-batch culture (Fong Chong et al., 2005).

To reduce the time spent on bioreactor turnover and to prevent the loss in HA synthesis capacity, a fill- and-draw culture (consisting in a repeated batch culture) was investigated by Chen et al. (2009) by keeping a volume of culture at the end of the exponential phase (in fact including medium and cells). Huang et al. (2008) also explored repeated batch culture. Given that this method leads to a problem of conservation in the middle of substrates and inhibitors

products for the HA production, several solutions to remove completely the medium were proposed. By equipping the reactor with an internal filter, a successfully cell separation for the next inoculum was achieved. Unfortunately, this filter was shown to support non-producers HA phenotype micro-organisms emerging due to batch succession but the use of an external filter to retain bacteria when draining the middle allows a stable increase in HA production along five repeated cycles.

Fed-batch production

HA production was shown to be both associated and non-associated with growth (Figure 4 and Figure 7). Application of fed-batch culture to laboratory scale represents an interesting way to characterize and to understand *Streptococcus zooepidemicus* metabolism because of the suitability of this process for kinetic studies to correlate growth rate and HA production rate. An application at an industrial scale of fed-batch "fermentation" is more complex to develop than batch culture and is known to foster cell growth at the expense of HA in competition for substrate. However, this culture mode could still represent an excellent way to optimize HA productivity. Assuming that HA production and cell growth requiring different culture conditions and therefore represent a sequential process, this method would allow to apply suitable limitations during the HA production.

Continuous production

Finally, as an under studied culture mode, continuous culture could be interesting to increase the time duration and cell stability in order to improve productivity and product quality and possibly downstream processing. Moreover, continuous culture approach can also reduce protein contamination and pathogenicity factors secretion by preventing the transition into the stationary phase (Leonard et al., 1998). A summary of studies available on cultivation mode is presented in Tableau 3.

Tableau 3. Comparative overview based on cultivation mode.

Source	Process set-up	Reference strain	HA concentration or HA productivity	HA molecular weight (MDa)	Cell concentration (g/L)
Liu et al., 2008b	Batch	*S. zooepidemicus* WSH24	5 g/L	x	13
	Fed-batch	*S. zooepidemicus* WSH24	4.7 g/L	x	17
Liu et al., 2008a	Two step culture Fed-batch/Batch	*S. zooepidemicus* WSH24	6.6 g/L	x	15
Vazquez et al.,2009	Batch	*S. zooepidemicus* ATCC35426	3 g/L	1.54	5.5
	Fed-batch	*S. zooepidemicus* ATCC35426	5 g/L	2.32	5.5
Chen et al.,2009	Fill-and-draw	*S. zooepidemicus* ATCC39920	0.4 g AH L^{-1} h^{-1}	x	x
Huang et al., 2008	Fill-and-draw	*S. zooepidemicus* ATCC39920	0.59 g AH L^{-1} h^{-1}	x	x
Blank et al., 2005	Continuous	*S. zooepidemicus* ATCC35426	25 % more in comparison with batch culture	x	x

Previously, that literature review has shown the different criteria or limiting factors, inherent to the production process of the HA, that have been widely studied. From the laboratory approach to the industrial one, it is necessary to include others considerations. As discussed before, strain stability, high broth viscosity or extrapolation feasibility are key limiting parameters in the case of industrial HA production by *Streptococcus zooepidemicus*. Strain stability is an example of parameter that can be studied and controlled at the laboratory scale without other adjustment during transition to the industrial scale. Stable strains over a prolonged time are easy to obtain due to the use of metabolic engineering, proper cells conservation and propagation conditions. If these steps are clearly defined, effective and carried out at the laboratory scale, the final storage and propagation at the industrial scale will

ensure microbial viability and genetic stability preventing from alterations in DNA sequence and thus maintaining biochemical and morphologic characteristics.

However, the consideration of a criterion such as broth viscosity will involve considering a wide array of associated criteria to avoid poor mass and heat transfer and to extrapolate at best, the correct HA production conditions, at an industrial scale.

Résumé et compléments

L'optimisation de la production d'AH peut intervenir à différents niveaux. A l'échelle de la souche tout d'abord en visant, par génie génétique ou mutagénèse aléatoire, à déléter ou sur-exprimer certains gènes liés à la synthèse d'AH. Mais aussi au niveau des conditions de mise en œuvre (milieu de culture, conditions physico-chimiques, mode de culture) afin de maintenir les souches productrices dans des conditions physiologiques traduisant le plus fidèlement son environnement de croissance et de production d'AH.

- La nature des sources nutritives apportées au cours de la culture microbienne est un paramètre clé. En effet, une modulation des différents rapports de sources carbonées, énergétiques et azotées ou une révision des apports en éléments clés liés au métabolisme de production de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*, tendront à rediriger les flux métaboliques de la voie centrale (fermentation homolactique et production de biomasse) vers la voie de production de l'AH. La Figure 10 présente la répartition des flux métaboliques communément retrouvée chez *Streptococcus zooepidemicus*.

- La température (37 °C) et le pH (maintenu à 7) sont des paramètres considérés comme maîtrisés.

- L'influence clé de l'oxygène sur le métabolisme de production de l'AH reste moins maîtrisée et peu commentée dans la littérature. Un trop faible apport en oxygène pourrait être préjudiciable pour la croissance bactérienne et la production d'AH tandis qu'un apport non maîtrisé pourrait se traduire par la formation de dérivés réactifs de l'oxygène ayant un impact direct négatif sur la chaîne polymérique d'AH.

- Le mode de culture le plus répandu pour la production d'AH est la culture en discontinu.

Document confidentiel

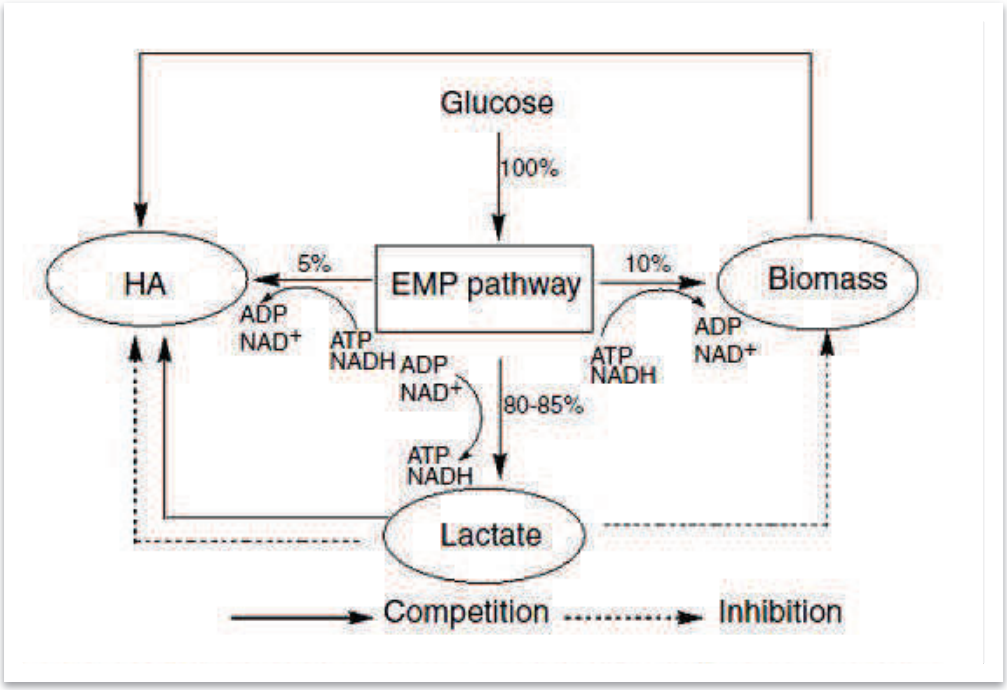


Figure 10. Schéma synthétique de la répartition des flux de glucose entre la production de biomasse, la production d'AH et l'accumulation d'acide lactique chez Streptococcus zooepidemicus.

Les méthodes d'optimisation de la production d'AH décrites dans la littérature sont nombreuses. La plus répandue est une approche d'amélioration et non d'optimisation de la production dite au « un facteur à la fois ». Outre le fait qu'elle est très chronophage, cette méthode ne permet pas de considérer les interactions entre les facteurs d'influence étudiés. Une approche préliminaire en vue d'une réelle optimisation consiste en la mise en place de plans d'expériences. L'idée principale du plan d'expériences est d'obtenir un maximum d'informations en mettant en œuvre un minimum d'expériences. Il est ainsi possible de déterminer les facteurs qui ont une influence significative sur la ou les réponses étudiées (criblage) mais aussi de modéliser et quantifier cette réponse en considérant la surface de réponse de l'ensemble des points du domaine étudié. Cette dernière approche semble être la plus adaptée à l'étude d'un processus, complexe et à multi-influence, telle la production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*.

4.2. Industrial process development and scale-up: the multicriteria approach

4.2.1. Multicriteria approach applied to microbial HA production process

The multicriteria approach is not limited to studies on HA yield and HA quality but proposes to consider and analyze other key issues for the feasibility of the industrial process from the cell scale (metabolic engineering) to the process scale (chemical engineering) steps described in Figure 8. Considering that HA is obtained from bacterial cultures whose conditions of implementation in bioreactor are generally poorly defined, this integrated approach is a powerful tool which acts both on physiological actuators and physicochemical factors to achieve technologically and economically optimized process. In addition to high HA production rate, it is imperative to consider other aspects such as the product quality, the safety of the process together with the safety of the final product, economical aspects (process scale, conditions of production, workforce…) and consequently process viability as a whole.

Thus, to improve HA production rates and HA quality, the implementation process must incorporate the defined constraints and propose the best compromise for an optimal parameter setting of selected limiting factors. To be more specific, in multicriteria approach, it is certainly of a great importance to consider groups of criteria and not criteria alone but this implies too to consider limiting factors organized in groups.

As an example, it is well described in literature that aeration and agitation and thus oxygenation conditions are known limiting factors which will impact on both HA concentration and HA molecular weight. Classically, studies propose “one factor at a time” approaches (impact of stirring on HA concentration or HA size) or multifactorial approaches (cross effects of stirring and aeration on HA concentration or HA size). Even if this method brings additional information on HA metabolism in *Streptococcus zooepidemicus*, it appears that considering such basic parameters is not sufficient to ensure technological transfer.

Here, the particularity of the multicriteria approach proposed in the case of HA microbial production process is to group the appropriated factors together, as one variable which can be

extrapolated, to study its impact on a group of criteria such as HA size and HA production rate. These variables could be then considered as representative of established criteria.

K_La could be a prime example as a technological factor associated with aeration, agitation and viscosity of HA in solution. It is easy to realize that with the consideration of such a parameter it will be easier to find a compromise between the keeping control of given oxygenation conditions and viscosity, and then, final HA molecular weight and concentration. Information about K_La are seldom provided in studies (Liu et al., 2009a, 2009b, 2009c, 2009d; Lai et al., 2012) and it is as a consequence rather difficult to rule out the oxygen transfer impact on HA production. On the one hand, part of studies suggests that increasing agitation and aeration rate is favorable to HA production because of better resulting oxygen mass transfer. On the other hand, several studies underlined the need for oxygen limitations in order to reduce the formation of ROS. Using values from literature, "Tableau 4" allows to consider a technological aspect such as K_La but also to integrate a key biological factor which is the specific oxygen consumption rate. This variable was calculated considering the reactor system over a sufficiently short period that we can assume biomass and pO_2 as a constant. In the liquid phase of the bioreactor the oxygen balance is expressed as detailed in equation (1) :

$$K_L a\,.(C^* - C).V - r'''O_2.V = \frac{d\,(V.C)}{dt} \quad (1)$$

where $r'''O_2$ (mol $O_2.h^{-1}$) represents the volumic oxygen consumption rate, KLa (h^{-1}) is the global oxygen mass transfer coefficient, V (m^3) the liquid phase volume, C* ($mol.L^{-1}$) the O_2 saturation level and C ($mol.L^{-1}$) the DO concentration.

For constant liquid phase volume and constant dissolved oxygen concentration we have equation (2) and (3):

$$r'''O_2 = K_L a\,.(C^* - C) \quad (2)$$

$$vO_2 = K_L a\,.\frac{(C^* - C)}{X} \quad (3)$$

Document confidentiel

where νO_2 (mol O_2/g X.h) represents the specific oxygen consumption rate, and X the stable biomass (g/L). These equations clearly shown that, when DO and biomass at a given time are stable, νO_2 equals the O_2 transfer rate. We thus consider that in theory oxygen supplied is in exact balance with the oxygen consumed by the cells but this does not necessarily mean that cells are not under oxygen limitation.

Tableau 4. Comparative study of K_La and specific oxygen demand, on HA concentration and HA size during batch culture of Streptococcus zooepidemicus.

Source	Average pO_2 for X_{max} (%)	Agitation rate (rpm)	Aeration rate (vvm)	Average K_La for X_{max} (h^{-1})	[X] (g/L)	νO_2 (mg O_2/gX.h^{-1})	[HA] (g/L)	HA size (MDa)
Liu, 2009b	**0.5**	**200**	**0.5**	**16**	**13**	**0.60**	**5**	**-**
Liu, 2009b	**8**	**600**	**0.5**	**20**	**13**	**12**	**5.5**	**-**
Liu, 2009b	**5**	**200**	**0.5**	**30**	**14**	**11**	**6.6**	**-**
Liu, 2009d	**1**	**200**	**0.5**	**10.5**	**13**	**0.78**	**5**	**-**
Liu, 2009d	**3**	**200-400**	**0.5-1**	**35**	**12**	**9**	**6.3**	**-**
Liu, 2009a	**7**	**200**	**0.5**	**36**	**16**	**16**	**6.25**	**1.6**
Lai, 2012	**20**	**Adjusted**	**1**	**63**	**12**	**105**	**4.25**	**15**
Liu, 2009c	**1**	**200**	**0.5**	**10**	**13**	**0.75**	**5**	**1.3**
Liu, 2009c	**10**	**200**	**0.5**	**35**	**13**	**26**	**6.5**	**0.8**

More specifically, considering νO_2 values given in "Tableau 4", it appears at first sight that oxygen specific consumption is rather low and thus, it can be assumed that HA production is either conducted because of an oxygen limitation or that oxygen limitation is a consequence of HA production. This overview shows that a more thorough consideration of technological and biological factors such as K_La and νO_2 will allow experimenter to raise the doubt about the oxygenation role in HA production. Studies considering K_La values propose simple

calculations according to the dynamic method (Christi et al., 2002) but potential oxygen limitation during growth and HA production and eventual metabolic disruption associated to the use of this method can be an obstacle to proper K_La calculation. A theoretical approach of K_La calculation (equation 4) based on the concept of Metzner and Otto (1957) in laminar regimes may be employed in this case through rheological measurements and equation below (Olmos et al., 2012):

$$K_L a = A . \frac{P_g}{V}^{\alpha} . U_g^{\beta} . \mu_a^{\gamma} \qquad (4)$$

where A, α and β are constant depending on the reactor design, γ is a constant usually set between -0.4 and -1 indicating a sensible negative impact of viscosity increase on the K_La, Ug (m/h) the superficial gas velocity, V the reactor volume, Pg ($kg.m^2.s^{-3}$) the power dissipation in aerated conditions and μa (Pa.s) the apparent viscosity given by the power law formula (equation 5):

$$\mu = K . \dot{\gamma}^{n-1} \qquad (5)$$

where K is the consistency factor, n the flow behavior index and where the average shear rate $\dot{\gamma}$ (s^{-1}) is given by the equation below (6):

$$\dot{\gamma} = k_s . N \qquad (6)$$

It is thus possible to calculate the average shear stress coefficient (according to the k_s value which will depend on the type of impeller used) and to calculate the apparent viscosity and the theorical associated K_La by determining the K and n coefficients by rheological measurements.

Consequently, to go even farther in this multicriteria approach, other correlated factors relative to the hydrodynamics such as agitation speed, impeller blade geometry and thus shear

Document confidentiel

stress may be considered because of their implication in HA production and specifically in HA final size. It is important to redefine precisely other extrapolated variables.

For example, in complement to K_La, power dissipation is closely associated with aeration parameters and is correlated with viscosity, tank reactor geometry and agitation speed. Keeping constant an appropriate K_La value for an optimal HA production rate, work will then focus on setting the adequate power dissipation value for an obtaining optimal HA size.

The calculation of the power dissipation involves referencing the different characteristics of each type of available impeller, the rheological characteristics of the polymer and therefore those of the performed mixing. In the case of HA production, high broth viscosity is quickly reached resulting in a non-Newtonian flow behavior and thus in a poor mass and heat transfer.

The power dissipation (P_g) in the case of an aerated bioreactor is described by the equation below (7):

$$P_g = P_0 \,.\, 0.1 \,.\left(\frac{Q}{N.V}\right)^{-0.25} . \left(\frac{N^2.d^4}{g.w.V^{0.67}}\right)^{-0.2} \qquad (7)$$

where N (rev/s) is the shaking frequency, Q (m^3/h) the aeration rate, g the constant of gravity, d and w (m) are constant depending on reactor dimensions and where P0 is the power dissipation ($kg.m^2.s^{-3}$) in the case of a non aerated bioreactor (equation 8) and is a function of density (ρ – kg/m^3), impeller number (n_a) and the power number (Np):

$$P_0 = Np.\rho.N^3.d^5.n_a \qquad (8)$$

The power number is a function of the impeller and tank used and its determination also depends on the flow regime that must be defined by calculation of the Reynolds number (Re) from the following relation (equation 9):

$$Re = \frac{\rho.N.d^2}{\mu_a} \qquad (9)$$

Document confidentiel

Therefore, because of high dynamic viscosity characteristics and thus complex rheology of the HA, it is difficult to work in a turbulent flow regime. As a consequence the methodology to calculate dissipated power or K_La differs drastically in the case of HA "fermentation" process. As described above, the reactor design methodology (Figure 11) and the selection of parameters that can be easily extrapolated allow calculating global hydrodynamic parameters during the transition from n to n+1 scale. It will lead the experimenter to consider parameters related to agitation and aeration such as K_La, shear stress and the power dissipation in order to assess the evolution of the mixing characteristic during scaling-up.

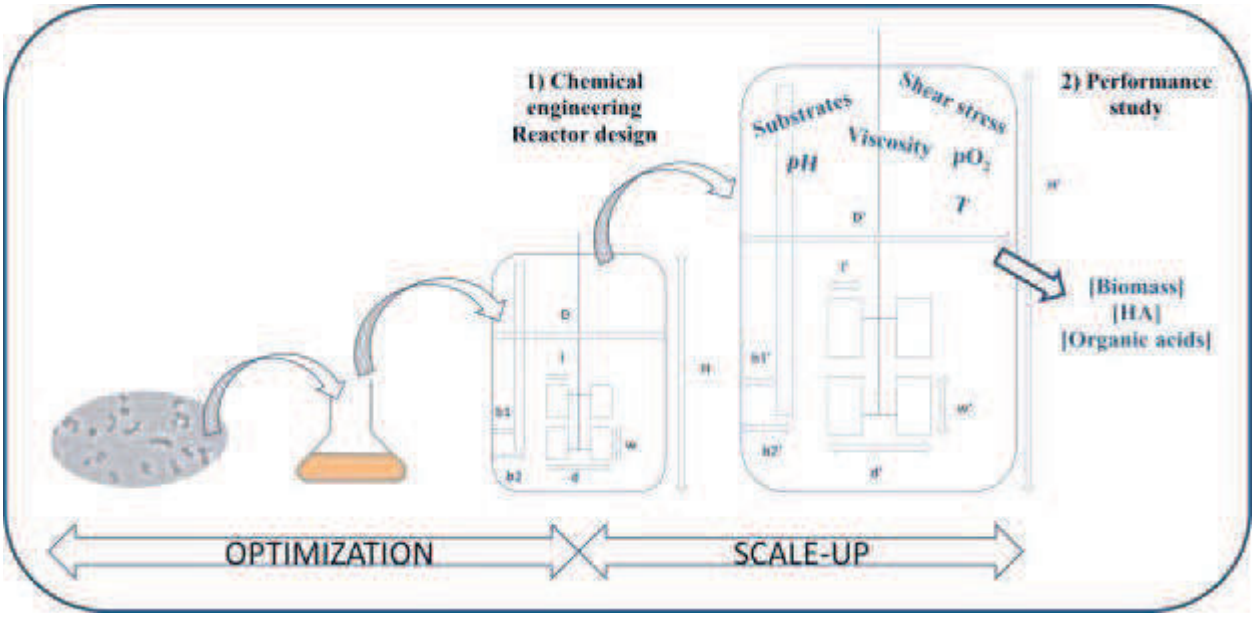


Figure 11. Scale-up principle and steps.

4.2.2. Multicriteria approach applied to scale-up

Scale-up methodology involves setting constant parameters such as geometric ratios similarities or impeller speed. But it is technically impossible to keep parameters all the same or proportional during the scaling. The effects of each parameter need to be weighted in order to choose the best compromise to maintain identical physicochemical conditions in the environment of each cell. Previous statements and further studies support the view that the power dissipation is a key parameter in the context of a process since extrapolation is closely correlated with both oxygen transfer (K_La) and homogenization time in the bioreactor (Palomares et al., 2009). Thus, as previously discussed, this key parameter has to be kept constant during scale-up, in correlation with pO_2, K_La (agitation / aeration) and peripheral speed (Kar et al., 2011).

Scale-up methodology will then integrate an experimental approach as part of the multicriteria approach. It will consider the performance of the method on the basis of the efficiency of physicochemical parameters used and measurement systems set. Indeed, such changes of scale could easily involve significant yield reductions. A compromise must be found in the extrapolation process to maintain the best performance by balancing between different limiting factors involved in the process (strain environment, physicochemical conditions, method of cultivation). Economic aspects linked to the mode of implementation, the workforce and raw materials, must also be considered.

5. Conclusion

Because of more and more stringent legislation about HA extraction from animal sources, microbial HA production using *Streptococcus zooepidemicus* emerges as being an interesting and practical alternative. Today, industrial HA production from bacterial strains play an important role regarding different medical or pharmaceutical applications of the final product. Different technological and biological parameters have been widely studied in order to optimize HA final concentration and HA quality. We highlighted that HA production process have to be considered as a multifactorial system that cannot be dealt with an "one factor at a time approach" because parameters such as strain, medium composition, pH, temperature and hydrodynamics are all associated with HA quality and production rates. Moreover we also underlined that all these parameters put together can affect rheology, mixing performance and thus mass transfer and heat transfer that can have a direct impact on HA production performances. This, sometimes even leading to stop production before raising an optimal HA concentration in order to preserve these parameters. It is thus crucial, given the lack of data, to considerate HA production system as a multifactorial process but also as a multicriteria process. We proposed here a chemical engineering oriented approach to facilitate both the laboratory performance studies and the industrial process extrapolation. This multicriteria approach allows us to focus on key parameters affecting HA production and HA quality. Even if strain type and medium composition play an important role on HA final yield, hydrodynamics parameters seems to be functional factors to extensively study the HA production issue. Indeed, multicriteria methodology based on hydrodynamics parameters is lacking in literature and more extensively in HA production process implementation at an industrial scale. A better description between oxygen transfer rate, power dissipation, heat

Document confidentiel

and mass transfer encountered in *Streptococcus zooepidemicus* HA production appears as essential to ensure optimal culture conditions in bioreactors.

En résumé

La prise en compte d'un problème sous un angle unique n'est pas une alternative viable et efficace pour le traitement de cas complexes tels que l'optimisation de la production d'AH par voie microbienne. Cette problématique intègre en effet un nombre important de facteurs influents, associés à un vaste éventail de critères requis exprimés en unités différentes (coûts, faisabilité) et complémentaires de la ou des réponses principales ciblées (concentration et tailles moléculaires produites) qui ont, elles aussi, leurs unités propres.

C'est pourquoi une approche initiale dite séquentielle tel le criblage au « un facteur à la fois » ne peut se dispenser ensuite d'une approche multifactorielle plus aboutie qui permettra d'étudier les effets croisés de paramètres clés identifiés grâce à l'approche séquentielle.

En outre, une approche multifactorielle doit ici être couplée à une approche décisionnelle propre, liée à une stratégie globale d'optimisation multicritère. Il ne va donc pas s'agir de rechercher un optimum mais plutôt de regrouper les facteurs ayant un impact sur la production d'AH en variables clés afin d'identifier une ou plusieurs « solution compromis ».

Document confidentiel

MATERIEL ET METHODES

Document confidentiel

SOMMAIRE DU MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL 48

1.1. REACTIFS POUR MILIEUX DE CULTURE 48
1.2. REACTIFS POUR ANALYSES ET DOSAGES 48
1.3. AUTRES REACTIFS 49
1.4. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE 49
1.5. CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE 49
1.6. ANALYSES RHEOLOGIQUES 49
1.7. MATERIEL DE MICROBIOLOGIE 50
1.8. CULTURES EN BIOREACTEURS EN PARALLELE DE 500 ML – INFORS 50
1.9. CULTURES EN BIOREACTEURS DE 3 OU 5 L 50
1.10. MATERIELS DIVERS 50

2. MODELES BIOLOGIQUES A DISPOSITION 51

2.1. SOUCHES « LABORATOIRE » 51
2.2. SOUCHE DE REFERENCE ATCC 39920 51

3. MILIEUX DE CULTURE 52

3.1. MILIEUX DERIVES DU BHI (BRAIN HEART INFUSION): STOCK ET PRE-CULTURE 52
3.2. MILIEU DE REFERENCE LAI 53
3.3. MILIEU PKN 54
3.3.1. Composition de base non optimisée 54
3.3.2. Formulation du milieu de culture PKN 55
3.3.2.1. Liste et origine des réactifs expérimentés 55

4. CULTURES DE *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* EN FIOLES D'ERLENMEYER 56

4.1. CONSERVATION DES SOUCHES 56
4.2. PRE-CULTURES ET CULTURES EN FIOLES D'ERLENMEYER 56
4.3. CULTURES EN FIOLES D'ERLENMEYER 57

5. CULTURE DE *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* EN BIOREACTEURS 57

5.1. CULTURE DISCONTINUE EN BIOREACTEURS DE 500 ML (INFORS), 3 L OU 5 L (APPLIKON) 57
5.2. CULTURE DISCONTINUE A ALIMENTATION ECHELONNEE EN BIOREACTEUR DE 3 L 58

6. STRATEGIE DE REVELATION ET D'AMELIORATION DE LA PRODUCTION D'AH CHEZ *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* 59

6.1. METHODES D'OBTENTION ET DE SELECTION DE SOUCHES D'INTERET INDUSTRIEL 59
6.1.1. Mutagénèse aléatoire 59
6.1.2. Sélection de souches 60
6.1.2.1. Sélection de souches non hémolytiques 60
6.1.2.2. Sélection de souches hyaluronidase négatives 60

7. METHODES DE SUIVI CINETIQUE SUR LES CULTURES DE *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* 61

7.1. MICROSCOPIE OPTIQUE 61
7.2. METHODES DE CHROMATOGRAPHIE POUR LE SUIVI DES SUBSTRATS ET PRODUITS AUTRES QUE L'AH 61
7.2.1. Suivi des substrats et des produits du métabolisme central 61
7.3. SUIVI DE LA BIOMASSE PRODUITE 62
7.3.1. Extraction de la gaine d'acide hyaluronique 62

7.3.2. Comptages microscopiques *62*
7.3.3. Spectrophotométrie *63*
7.4. DOSAGE ET CARACTERISATION DE L'AH 63
7.4.1. Extraction de l'AH capsulaire *63*
7.4.2. Quantification de l'AH : dosage au bromure de cétyltriméthyl ammonium(CTAB) *63*
7.4.3. Caractérisation de l'AH *64*
7.4.3.1. Préparation des échantillons par précipitation à l'éthanol 65
7.4.3.2. Chromatographie d'exclusion stérique 65
7.4.3.3. Mesure de la viscosité dynamique par rhéomètrie 66
7.4.3.3.1. Détermination de la viscosité dynamique 66
7.4.3.3.2. Mesure du transfert d'oxygène théorique dans le cas d'un fluide non Newtonien 67
8. PLANIFICATION EXPERIMENTALE 67
9. INTERPRETATION DES RESULTATS 68
9.1.1. Calcul de vitesses spécifiques *68*
9.1.2. Calcul de rendements *69*
9.1.3. Taux de recouvrements carbonés *69*

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Schéma récapitulatif des différents systèmes de culture de Streptococcus zooepidemicus et de leur agencement. *59*

Figure 2. Photographie de colonies de Streptococcus zooepidemicus sur milieu gélosé au sang. Les halos clairs autour des différentes colonies mettent en avant une activité β-hémolytique. *60*

Figure 3. Résumé du protocole mis au point au laboratoire pour la révélation sur milieu solide de l'activité de dégradation de l'AH par les hyaluronidases bactériennes. *60*

Figure 4. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique. *64*

Figure 5. Schéma du procédé de mesure viscosimétrique dans le cas d'un système de modules cône/plan. La flèche indique que le module conique supérieur est en rotation continue (sous air comprimé pour éviter tout frottement) lors de la mesure. *66*

Figure 6. Profil rhéofluidifiant d'un échantillon de fin de culture microbienne. La viscosité dynamique est ici représentée en fonction d'une large gamme de taux de cisaillement. *67*

Figure 7. Exemple d'un plan composite à faces centrées (3 facteurs, 3 niveaux) dans laquelle les points verts représentent les points du plan factoriel ([-1 ; -1 ; -1], [-1 ; +1 ; -1],...),ceux en bleu foncé correspondent aux points en étoile ([0 ; -1 ; -1], [-1 ; 0, +1]...) et où le point bleu clair est le centre du domaine ([0; 0; 0]), qui est répété 3 fois afin de vérifier la fiabilité du système (erreur expérimentale). *68*

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Référencement et origine des souches de S. zooepidemicus disponibles au laboratoire. 52

Tableau 2 Composition du milieu complexe BHI-Broth (pour 1 L d'eau osmosée)....53

Tableau 3 Composition du milieu de culture modifié LAI (pour 1 L d'eau ultra-pure) 53

Tableau 4 Composition optimisée du milieu PKN (pour 1 L d'eau ultra-pure)....54

Tableau 5. Tableau récapitulatif des différents apports nutritifs expérimentés lors de la formulation du milieu de culture....55

Tableau 6. Composition du cocktail de vitamine utilisé pour les essais de formulation du milieu PKN.....56

Tableau 7. Liste des différents standards utilisés en CLHP ainsi que de leurs concentrations respectives en eau ultra-pure.....62

1. Matériel

1.1. Réactifs pour milieux de culture

BHI-Broth(Infusion cœur-cervelle)	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
D(+) Glucose monohydraté	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Sang de mouton	Biomérieux	Craponne, France
Agar	BD	Le Pont de Claix, France
NaCl	Fluka	Buchs, Suisse
$(NH_4)_2PO_4$	Fluka	Buchs, Suisse
$MgSO_4$	Fluka	Buchs, Suisse
K_2HPO_4	Carlo Erba	Val de Reuil, France
KH_2PO_4	Carlo Erba	Val de Reuil, France
$CaCl_2$	Fluka	Buchs, Suisse
$NaC_2H_3O_2$	Fluka	Buchs, Suisse
$NaHCO_3$	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
$MnSO_4$	Fluka	Buchs, Suisse
Na_2HPO_4	Carlo Erba	Val de Reuil, France
NaH_2PO_4,H_2O	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Peptone de soja	Organotechnie	La Courneuve, France
Extraits de levure 444	Kerry	Beloit, UEA
D-biotine	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
D-pantothénate de calcium	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Chlorure de choline	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Acide folique	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
I-inositol	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Nicotinamide	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Pyridoxal, HCl	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Riboflavine	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Thiamine, HCl	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.

1.2. Réactifs pour analyses et dosages

Acide sulfurique	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Acide pyruvique	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Acide formique	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Acide lactique	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Acide acétique	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Acétonitrile	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Acide trifluoroacétique	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
SDS	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Isopropanol	Carlo Erba	Val de Reuil, France
PEO (standard oxyde de polyéthylène)	Malvern	Worcestershire, R.U

Document confidentiel

Dextran	Malvern	Worcestershire, R.U

1.3. Autres réactifs

NTG (N-méthyl, N'-nitro, N-nitrosoguanidine)	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Thiosulfate de sodium	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
Hyaluronidase	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
CTAB (bromure de cétyl-triméthyl ammonium)	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
NaOH	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Glycérol	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.
PEG (Polyéthylène glycol, 19 kDa)	Fluka	Buchs, Suisse
Ethanol 96%	Carlo Erba	Val de Reuil, France
Acide hyaluronique	HTL	Javené, France
Réactifs de Gram	Sigma Aldrich	Milwaukee, E.U.A.

1.4. Chromatographie liquide haute performance

Chaîne LC20 avec injecteur automatique, détecteur à barrettes de diodes et réfractomètre différentiel	Shimadzu	Noisiel, France
Logiciel d'acquisition et traitement LC solution	Shimadzu	Noisiel, France
Colonne Aminex HPX-87H	Biorad	Marnes la Coquette, France
Colonne SugarPak	Waters	Guyancourt, France

1.5. Chromatographie d'exclusion stérique

Chaine GPC max deViscotek avec détecteurs TDA 305 (Triple/Tetra Detector Array) de Viscotek et colonnes ViscoGEL A7000 et A6000M	Malvern	Worcestershire, R.U
Logiciel Omnisec	Malvern instruments	Worcestershire, R.U

1.6. Analyses rhéologiques

Rhéomètre Kinexus	Malvern	Worcestershire, R.U
Modules conique CS 2/50	Malvern	Worcestershire, R.U
Module plan PL 65	Malvern	Worcestershire, R.U
Logiciel rSpace	Malvern instruments	Worcestershire, R.U

1.7. Matériel de microbiologie

Autoclave (100 L)	Science Médecine Industrie	Montpellier, France
Etuve, Memmert	Bioblock Scientific	Strasbourg, France
Incubateur HPE	Firlabo	Meyzieu, France
Incubateur Innova 44	New Brunswick Scientific	Enfield, E.U.A.
PSM	ESI FluFrance	Val de Reuil, France
Fioles d'Erlenmeyer 250 mL	Schott	Clichy, France

1.8. Cultures en bioréacteurs en parallèle de 500 mL – Infors

Cuve 3 ou 5 L. et platine	Infors	Bottmingen, Suisse
Contrôleur principal Sixfors	Infors	Bottmingen, Suisse
Gaine chauffante	Infors	Bottmingen, Suisse
Sonde température	Infors	Bottmingen, Suisse
Electrode pH et pO_2	Infors	Bottmingen, Suisse
Sonde pO_2	Infors	Bottmingen, Suisse
Cryostat	LKB	Paris, France
Système pompe péristaltique	Infors	Bottmingen, Suisse
Logiciel de supervision Iris	Infors	Bottmingen, Suisse

1.9. Cultures en bioréacteurs de 3 ou 5 L

Cuve 3 ou 5 L. et platine	Applikon	Schiedam, Pays-Bas
Contrôleur principal ADI 1030	Applikon	Schiedam, Pays-Bas
Régulateur agitation ADI 1016	Applikon	Schiedam, Pays-Bas
Manteau chauffant	Applikon	Schiedam, Pays-Bas
Sonde température	Applikon	Schiedam, Pays-Bas
Electrode pH/rH	Metler Toledo	Viroflay, France
Sonde pO_2	Broadley James	Irvine, E.U.A.
Cryostat	LKB	Paris, France
Pompe péristaltique	Masterflex	Chicago, E.U.A.
Logiciel de supervision BioXpert	Applikon	Schiedam, Pays-Bas

1.10. Matériels divers

Filtres acétate de cellulose 0,22 µm	Millipore	Molsheim, France
Filtres acétate de cellulose 0,45 µm	Millipore	Molsheim, France
Plaques 96 puits fond plat	VWR	Fontenay sous Bois, France

Microscope Laborlux 12	Leica	Nanterre, France
Caméra EC3 pour microscope	Leica	Nanterre, France
pH mètre Phm210	MeterLab	Vileurbanne, France
Balance de précision AT200	Mettler	Greifensee, Suisse
Balance Precisa 6000D	PAG Oerlikon	Zurich, Suisse
Pipettes automatiques	Biohit, Sartorius	Dourdan, France
Vortex Top Mix	Bioblock Scientific	Strasbourg, France

Document confidentiel

Agitateur orbital Polymax 1040	Heidolph	Schwabach, Allemagne
Spectrophotomètre Cary 50 Scan	Agilent Technologies	Les Ulis, France
Spectrophotomètre Multiscan Go	Thermo Scientific	Waltham, E.U.A.
Centrifugeuse Megafuge 16	Thermo Scientific	Waltham, E.U.A.
Cellules de Thoma	Assistent Technologies	Sondheim, Allemagne
Lecteur de glycémie Performa nano	Accu Chek (Roche)	Meylan, France
Galerie Api 20 Strep.	Biomérieux	Craponne, France

2. Modèles biologiques à disposition

Toutes les souches utilisées au cours de ces travaux ont été identifiées comme appartenant à l'espèce naturellement productrice d'acide hyaluronique *Streptococcus zooepidemicus*. Elles sont le plus souvent isolées à partir d'abcès issus d'infections chez le cheval mais peuvent aussi avoir pour origine la vache, le lapin, le porc et plus rarement l'homme.

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour but de se focaliser sur des souches non modifiées de *Streptococcus zooepidemicus*. Deux origines sont retrouvées : des souches issues de prélèvements vétérinaires mais aussi des souches de référence issues de collections.

2.1. Souches « laboratoire »

Un total de 7 souches dites « environnementales » a été isolé à partir de prélèvements à visée microbiologique chez le cheval suite à divers diagnostics infectieux liés à *Streptococcus zooepidemicus* Tableau 1. L'identification des souches a été réalisée au moyen d'une batterie de tests biochimiques (galerie d'identification des Streptocoques API 20). La souche TDF n'a pas été isolée dans les mêmes conditions et est issue d'une remise en suspension liquide (milieu BHI) d'AH microbien stérile suivi d'un isolement sur boite de Petri après qu'une croissance bactérienne eut été observée.

2.2. Souche de référence ATCC 39920

Une souche connue pour ses capacités de production de molécules d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire est utilisée en tant que modèle d'étude. Cette souche dite « référence » est issue de la souchothèque du centre de ressource biologique de Manassas (Virginie – États-Unis) ou American Type Culture Collection (ATCC).Cette souche est

Document confidentiel

largement utilisée par les auteurs de publications concernant la production d'AH par voie microbienne.

Tableau 1. Référencement et origine des souches de S. zooepidemicus *disponibles au laboratoire.*

Dénomination	Source
ATCC39920	ATCC
ATCC 6580	ATCC
2398	Plaie carpe
5361	Plaie paturon postérieur face interne
6439	Abcès encolure
10062	Pyodermite
11053	Abcès fessier (fistulisé)
11248	Abcès encolure
TDF	Isolement stérile à partir d'AH de 0,5 MDa

3. Milieux de culture

Tous les milieux de cultures sont stérilisés à l'autoclave à 121°C, pendant 20 min. Les solutions de glucose sont stérilisées séparément et ajoutées post-stérilisation.

3.1. Milieux dérivés du BHI (Brain Heart Infusion): stock et pré-culture

Le milieu BHI est un milieu nutritif semi-défini, tamponné, à base d'infusions de tissus de cœur et de cervelle ainsi que de peptones, qui apporte les protéines et autres nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes exigeants tels que *Streptococcus zooepidemicus*. Sa composition est détaillée dans Tableau 2 ci-dessous. 37 g de matière sèche sont apportés pour un litre d'eau osmosée en volume final.

Ce milieu de référence, utilisé tel quel pour la réalisation des stocks, sert aussi de base nutritive pour la réalisation des pré-cultures à savoir, pour les premières étapes de régénération en milieu solide (supplément de 15 g d'agar par litre de milieu liquide BHI et de sang de mouton à raison de 5%, v/v) et en milieu liquide (supplément de 20 g/L de glucose).

Tableau 2 Composition du milieu complexe BHI-Broth (pour 1 L d'eau osmosée)

Milieu BHI-liquide ou bouillon

Composition du milieu liquide BHI en g/L d'eau osmosée	
Na_2HPO_4 ……	2,5
NaCl ……...	5
Infusion de cœur de bœuf ……..……	5
Infusion de cerveau de veau …….....	12,5
Peptone ……...	10
D(+)- glucose …….	22

3.2. Milieu de référence LAI

Ce milieu, aisé de préparation, est utilisé pour la mise en œuvre de cultures et pré-cultures en fioles d'Erlenmeyer et de cultures en bioréacteurs. Le milieu LAI est un milieu modifié au laboratoire dont la composition initiale est issue de la littérature (Lai et al., 2011). C'est un milieu semi-défini puisque hormis l'ajout de peptones et d'extrait de levure, sa composition est maitrisée (Tableau 3).

Tableau 3 Composition du milieu de culture modifié LAI (pour 1 L d'eau ultra-pure)

Milieu LAI modifié (Lai et al., 2011)

Composition en g/L d'eau ultra-pure	
$(NH_4)_2PO_4$ ……	0,5
$MgSO_4$ …….	0,5
K_2HPO_4 ……..	2
KH_2PO_4 ……..	2
Extrait de levure 444 (Kerry) ……	10
Peptone de soja E110 (Organotechnie) …….	10
D(+)- glucose ……..	12,5 à 70*

* La concentration initiale en glucose peut varier en fonction des différents essais effectués ainsi qu'en fonction de la nature de la culture réalisée (pré-culture, culture).

3.3. Milieu PKN

3.3.1. Composition de base non optimisée

Le milieu PKN a été formulé au laboratoire. Sa composition de base avant optimisation est décrite dans le Tableau 4 et prend en considération un cahier des charges bien défini (formulation du milieu de culture – Chapitre III de la partie Résultats). Ce milieu est utilisé dans certaines étapes de pré-culture ainsi que pour la mise en œuvre des cultures en bioréacteurs.

Tableau 4 Composition optimisée du milieu PKN (pour 1 L d'eau ultra-pure)

Base du milieu PKN

Composition en g/L d'eau ultra-pure	
$MnSO_4$ ……	0,01
$MgSO_4$ ……	1
K_2HPO_4 …….	0,2
KH_2PO_4 …….	1
$CaCl_2$ …….	0,01
$NaC_2H_3O_2$……	4,5
$NaHCO_3$…….....	2,5
NaH_2PO_4, H_2O ……..	3,19
Na_2HPO_4 ……..	7,35
Peptone de soja E110 (Organotechnie) …….	13,8
Extrait de levure 444 (Kerry) ……	30
D(+)- glucose ……	5 à 70*

* La concentration initiale en glucose peut varier en fonction des différents essais effectués ainsi qu'en fonction de la nature de la culture réalisée (pré-culture, culture).

Document confidentiel

3.3.2. Formulation du milieu de culture PKN

3.3.2.1. Liste et origine des réactifs expérimentés

Tableau 5. Tableau récapitulatif des différents apports nutritifs expérimentés lors de la formulation du milieu de culture

Classe	Réactif	Origine
Sources carbonées et énergétiques	Glucose	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Saccharose	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Lactose	Merck, Darmstadt, Allemagne
Apports complexes C, N, S, vitamines, oligo-éléments	Peptones de blé E1	Organotechnie, La Courneuve, France
	Peptones de soja E110	Organotechnie, La Courneuve, France
	Peptones de caséines K3	Organotechnie, La Courneuve, France
	Primatone P37	Kerry, Beloit, EUA
	Peptones 4601N	Kerry, Beloit, EUA
	Peptones de soja	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Peptones de colza	LRGP*, Nancy, France
	Extrait de levure 412	Kerry, Beloit, EUA
	Extrait de levure 413	Kerry, Beloit, EUA
	Extrait de levure 444	Kerry, Beloit, EUA
Apports spécifiques	Méthionine	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Glutamine	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Pyruvate	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Tween 80	Sigma Aldrich, Milwaukee, EUA
	Vitamines**	Origine cf. 1.1

* Laboratoire Réactions et Génie des Procédés.
**mélange de vitamines dont la composition est détaillée ci-dessous.

Le mélange de vitamines est préparé sous forme de concentré dans 10 mL d'eau ultrapure (qsp) et stérilisé sur membrane de 0,22 µm (Millipore). Il est apporté au milieu à raison de 1 % (v/v) (Tableau 6).

Tableau 6. Composition du cocktail de vitamine utilisé pour les essais de formulation du milieu PKN.

Mélange de vitamines	
Composition en mg/L d'eau ultra-pure	
D-biotine …….	1
Calcium de D-pantothénate ……	1
Chlorure de choline ……	1
Acide folique …….	1
I-inositol ……	2
Nicotinamide …….	1
Pyridoxal, HCl ……..	1
Riboflavine ……	0,1
Thiamine, HCl ……	1

4. Cultures de *Streptococcus zooepidemicus* en fioles d'Erlenmeyer

4.1. Conservation des souches

Mis à part pour la souche TDF, chacune des souches est issue d'un lyophilisat de départ remis en culture en fioles d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu BHI. Un isolement est ensuite réalisé sur milieu BHI solide afin de réaliser une culture monoclonale en milieu BHI liquide. Une fois la phase exponentielle atteinte, toutes les souches sont stockées à -80°C et cryopréservées dans du glycérol (30%, v/v). Le conditionnement est réalisé en cryo-tubes de 2 mL de contenance.

La remise en culture des cellules stockées (24h à 37°C) est réalisée dans 100 mL de milieu BHI en fioles d'Erlenmeyer de 250 mL avant régénération sur milieu BHI solide enrichi au sang de mouton (5%, v/v).

4.2. Pré-cultures et cultures en fioles d'Erlenmeyer

Après régénération en milieu liquide à partir d'un aliquot stocké à -80° ou sur milieu solide (gélose enrichie au sang de mouton) toutes les pré-cultures et les cultures à petite échelle sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL de milieu de

culture BHI additionnés de 20 g/L de glucose. L'incubation se fait sur une durée allant de 14 à 24 h pour atteindre une DO finale à 600 nm comprise entre 1,2 et 1,7 selon les souches. La température et la fréquence d'agitation sont respectivement régulées à 37 °C et 160 tr/mn.

4.3. Cultures en fioles d'Erlenmeyer

Toutes les cultures en fioles d'Erlenmeyer sont réalisées au minimum en duplicata. Une erreur de 5 % est tolérée pour chacun des essais. Elles sont inoculées à partir des pré-cultures à raison de 5.10^7cell/mL dans 100 mL de milieu neuf (fioles d'Erlenmeyer de 250 mL). L'incubation se fait à 37 °C et 160 tr/mn. Lors des cultures microbiennes en fioles d'Erlenmeyer, un suivi de l'évolution du pH est réalisé à l'aide d'un pH-mètre sur des prélèvements hors ligne.

5. Culture de *Streptococcus zooepidemicus* en bioréacteurs

5.1. Culture discontinue en bioréacteurs de 500 mL (Infors), 3 L ou 5 L (Applikon)

Les cultures microbiennes en discontinu sont réalisées sur une durée de 24 à 72h dans des cuves en verre de 500 mL (volume utile de 300 mL), 3 L (volume utile de 2 L) et 5 L (volume utile de 4 L). Elles sont obturées au moyen d'une platine en acier. Le volume final de milieu de culture doit prendre en considération l'ajout post-stérilisation du glucose (2,5 à 14 % en volume) et de l'inoculum (5%). La platine est équipée :

- d'un arbre d'agitation auquel sont fixés deux mobiles d'agitation (de type « Rushton » ou «pales inclinées » ou « oreilles d'éléphant ») comprenant 3 ou 4 pales qui permettent une agitation entre 400 et 800 tr/min. 3 contre-pales statiques permettent d'assurer une meilleure homogénéisation du milieu ainsi qu'un meilleur transfert d'oxygène,
- d'un condenseur ou colonne réfrigérante permettant le passage des gaz dégagés,
- d'une entrée d'air munie d'un « sparger » à fines bulles permettant un contrôle de l'aération jusqu'à 1 vvm. L'air comprimé est ajouté en continu au cours de la régulation tandis que l'injection d'oxygène pur est contrôlée à l'aide d'un rotamètre et d'une électrovanne,

- de canules pour le prélèvement et le soutirage de milieu au cours de la culture microbienne,
- d'entrées pour les sondes température, pH**,** rH (uniquement sur 3 et 5 L) et pO_2 ainsi que pour un septum (ajout d'antimousse).

La température est régulée à 37°C à l'aide d'un manteau chauffant (Applikon) ou d'une gaine (Infors) et par une circulation d'eau alimentée par un cryostat. Le pH est régulé à 7 à l'aide d'une solution de soude à 4 M apporté au moyen une pompe péristaltique délivrant un débit constant. L'ensemble des régulations est assurée à l'aide du module de supervision Biocontroller ADI 1030 (Applikon) ou Biocontroller Sixfors (Infors), lui-même placé sous la supervision du logiciel BioXpert (Applikon) ou Iris (Infors) permettant de modifier les points de consigne soit sur une base temporelle donnée, soit en fonction d'évènements définis.

5.2. Culture discontinue à alimentation échelonnée en bioréacteur de 3 L

Le déroulement des expériences réalisées dans ce cas est initialement semblable à celui des fermentations conduites en discontinu. La seule différence réside dans la mise en œuvre d'alimentations échelonnées réalisées à l'aide d'un système d'injection rapide de milieu frais par surpression d'air comprimé. Un suivi approximatif mais rapide de la concentration en glucose est, quant à lui, réalisé heure par heure à l'aide d'un lecteur de glycémie, de façon à réaliser au mieux les ajouts nutritifs.

Un schéma synthétique des différents protocoles de pré-culture et de culture de *Streptococcus zooepidemicus* est présenté dans la Figure 1 ci-dessous.

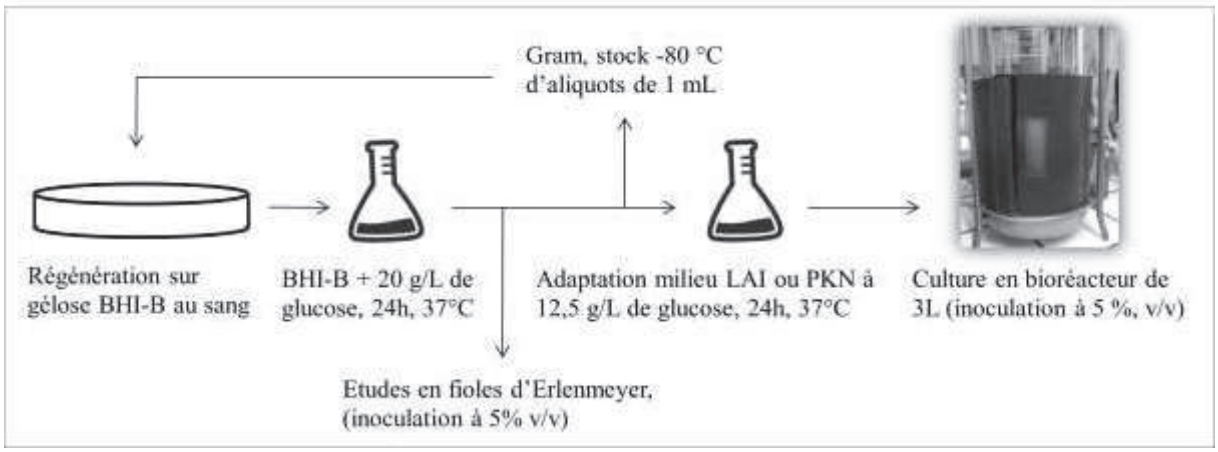


Figure 1. Schéma récapitulatif des différents systèmes de culture de Streptococcus zooepidemicus *et de leur agencement.*

6. Stratégie de révélation et d'amélioration de la production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*

6.1. Méthodes d'obtention et de sélection de souches d'intérêt industriel

6.1.1. Mutagénèse aléatoire

Un protocole adapté aux souches de *Streptococcus zooepidemicus* a été mise au point au laboratoire afin d'une part d'éliminer le caractère hémolytique indésirable pour une application potentielle dans le cas d'une production d'AH, et, d'autre part, de développer un caractère hyper-producteur dans le but d'optimiser la concentration d'AH produite ainsi que sa taille moléculaire.

L'intégralité du protocole de mutagénèse aléatoire est réalisée en conditions aseptiques. Après 24h de culture en milieu BHI (paragraphe 4.2), 5 mL de culture sont prélevés et centrifugés à 15000 g pendant 15 mn. Le volume est réajusté à 40 mL en tampon phosphate stérile 0,05 M pour une dilution adaptée à une mesure spectrophotométrique de la biomasse. 10^8 cellules sont ainsi mises en contact de l'agent mutagène, la N-méthyl, N'-nitro, N-nitrosoguanidine (NTG), à concentration finale de 0,5 g/L et ce pour une durée de 2 heures. Le traitement mutagène est alors interrompu par l'addition d'une solution de thiosulfate de sodium 1% (m/v). La suspension ainsi obtenue est ensuite diluée avec de l'eau physiologique stérile et étalée en vue de la sélection ultérieure sur des boîtes de gélose au sang.

Le protocole de traitement mutagène dose / temps d'action a été défini au préalable en se basant sur un indicateur d'efficience macroscopique qui est le taux de mortalité cellulaire. En effet, un taux de mortalité proche de 99 %, considéré comme optimal, est atteint avec le barème en question et est vérifié expérimentalement pour chaque mutagenèse par numération cellulaire à l'aide de la technique des dilutions-subcultures. Cette valeur de 99% correspond à un compromis entre des altérations chimiques nombreuses de l'ADN dépassant les capacités de réparation des cellules et une probabilité acceptable d'obtenir des cellules viables.

6.1.2. Sélection de souches

6.1.2.1. Sélection de souches non hémolytiques

La révélation de ce caractère se fait sur gélose au sang (milieu BHI + agar à 15 g/L additionné de sang de mouton à raison de 5 %). La présence ou non d'un halo clair d'hémolyse autour des colonies sert d'indicateur (Figure 2).

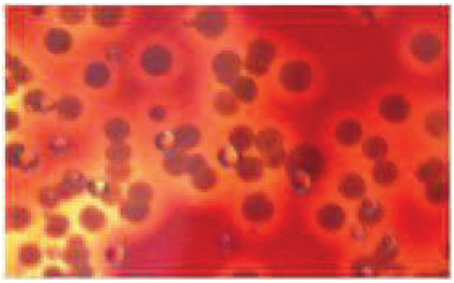


Figure 2. Photographie de colonies de Streptococcus zooepidemicus sur milieu gélosé au sang. Les halos clairs autour des différentes colonies mettent en avant une activité β-hémolytique.

6.1.2.2. Sélection de souches hyaluronidase négatives

Un protocole simplifié de sélection sur milieu solide a pu être développé au cours de cette étude (Figure 3).

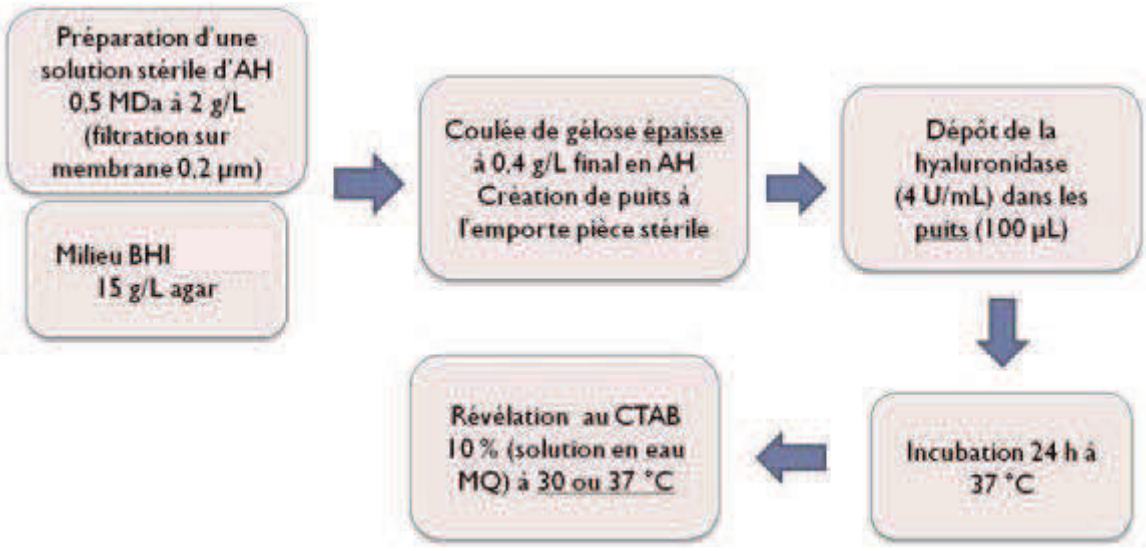


Figure 3. Révélation au CTAB 10 % (solution en eau MQ) à 30 ou 37°C pendant 6 à 24 h selon l'activité hyaluronidasique .

7. Méthodes de suivi cinétique sur les cultures de *Streptococcus zooepidemicus*

7.1. Microscopie optique

Le suivi microbiologique qualitatif de la bonne mise en œuvre des pré-cultures et cultures en bioréacteurs est réalisé par coloration de Gram et observation au microscope optique muni d'une caméra.

7.2. Méthodes de chromatographie pour le suivi des substrats et produits autres que l'AH

7.2.1. Suivi des substrats et des produits du métabolisme central

Les principaux substrats (glucose) et produits du métabolisme central (lactate, acétate) sont dosés dans le surnageant de culture par chromatographie liquide haute performance (CLHP). Les surnageants sont obtenus par dilution au ¼ de l'échantillon, centrifugation à 15000 g pendant 20 min et filtration frontale sur des membranes de 0,22 µm en acétate de cellulose.

La chaine CLHP comprend une pompe délivrant un débit constant en H_2SO_4 (0,01 N) de 0,7 mL / min (élution isocratique) et un passeur automatique (volume d'injection de 1 à 10 µL selon la concentration et la masse moléculaire de l'acide hyaluronique).

- Pour l'analyse du glucose et des acides organiques, la séparation se fait sur colonne de séparation échangeuse d'anions HPX-87H, thermostatée dans un four maintenu à température maximale préconisée de 65°C afin de faciliter la dépolymérisation de l'acide hyaluronique (Lowry et al., 1994).
- Pour l'analyse des autres glucides (lactose, saccharose), la séparation se fait sur colonne de séparation échangeuse de cations SugarPak, thermostatée à 85°C. Le débit de pompe est dans ce cas ajusté à 0,5 mL/min. La phase mobile utilisée est de l'eau ultra-pure.

La détection est effectuée à l'aide d'une barrette de diodes focalisée sur 214 nm pour les acides organiques et d'un réfractomètre différentiel pour le glucose, les glucides en général et les produits comprenant des carbones asymétriques tels que le lactate. Les standards listés dans le Tableau 1 sont utilisés pour l'étalonnage. Ils sont préparés aux concentrations

adéquates en eau ultra-pure. Une injection de 10 µL de chacune des solutions-étalon permet la définition de courbes de calibration sous le logiciel Labsolution.

Tableau 7. Liste des différents standards utilisés en CLHP ainsi que de leurs concentrations respectives en eau ultra-pure.

Standards C.L.H.P - Glucides et acides organiques	
Glucose……..	20 g/L
Lactose……..	10 g/L
Saccharose…….	10 g/L
Acide acétique…….....	10 g/L
Acide lactique…….....	10 g/L
Acide formique…….	10 g/L
Acide pyruvique……	1 g/L

7.3. Suivi de la biomasse produite

7.3.1. Extraction de la gaine d'acide hyaluronique

Afin de pouvoir réaliser une mesure basée uniquement sur les cellules et non sur leur gangue d'AH, une extraction de la gaine d'AH doit, tout d'abord, être réalisée par ajout d'un volume de sodium dodecyl-sulfate (SDS) à 0,1 M. Le SDS est conservé à 4°C jusqu'à extraction et le mélange est vortexé pendant un minimum de 30 secondes avant centrifugation (15000 g, 20 mn). Le surnageant est ensuite éliminé et la fraction cellulaire dépourvue de sa gaine d'AH est reprise dans un volume de tampon phosphate. Les dilutions nécessaires aux comptages microscopiques et mesures par spectrophotométrie sont alors réalisées.

7.3.2. Comptages microscopiques

Les comptages microscopiques sont réalisés sur cellule de Thoma à l'aide d'un microscope optique au grossissement global x400 intégrant le binoculaire (x10) et l'objectif à proprement parler (x40). Le comptage est réalisé systématiquement sur 16 carrés et ce en triplicat afin de réaliser une moyenne. La concentration cellulaire finale est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$c = N \,.\, 16 \,.\, Fd \,.\, 10\,000$$

où c représente la concentration cellulaire (cell / mL), Fd le facteur de dilution et N le nombre de cellules moyen comptabilisé sur un ensemble de 16 carrés.

7.3.3. Spectrophotométrie

La densité optique de la matière cellulaire remise en suspension en tampon phosphate (pH 7 ; 0,1 M) est mesurée à 600 nm par spectrophotométrie. La mesure de DO est ensuite corrélée à la concentration cellulaire (en cell/mL) à l'aide de droites d'étalonnage, définies au préalable pour chacune des souches à disposition.

7.4. Dosage et caractérisation de l'AH

7.4.1. Extraction de l'AH capsulaire

Les essais d'extraction de l'AH capsulaire ont été mis en œuvre selon le protocole développé par Goh (1998). Un volume d'une solution à température ambiante de SDS à 0,1 % (m/v) est ajouté à un volume de culture bactérienne avant d'être vortexé et mis à agiter pendant 15 mn sur un agitateur orbital. Le mélange est ensuite centrifugé et filtré sur membrane d'acétate de cellulose de 0,45 µm.

7.4.2. Quantification de l'AH : dosage au bromure de cétyltriméthyl ammonium(CTAB)

Les échantillons de culture sont préalablement dilués en eau ultra-pure et centrifugés à 15000 g pendant 20 mn. Le surnageant de culture est récupéré et filtré sur membrane d'acétate de cellulose de 0,22 µm de diamètre de pores.

La quantification de l'AH est réalisée par la méthode au CTAB, selon Oueslati *et al,*.(2014). Elle permet de doser rapidement la concentration en AH libre. Ce dosage turbidimétrique est basé sur des interactions ioniques entre le CTAB, chargé positivement, et l'AH, chargé négativement, qui vont former un complexe insoluble, de couleur blanche.

Le réactif au CTAB consiste en une solution de soude à 2% (m/v) et de CTAB à 2,5% (m/v) solubilisée en eau ultra-pure. Cette solution est conservée à 37°C jusqu'à réaction pour un dosage optimal. Le dosage est exécuté comme suit en microplaque à 96 puits:

- 50 µL d'échantillon et 50 µL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7) sont déposés
- la plaque est mise à agiter et à incuber pendant 15 minutes à 37 °C
- 100 µL de réactif au CTAB (37 °C) sont ajoutés dans chacun des puits
- la plaque est mise à agiter et incuber pendant 10 minutes à 37 °C

La mesure de turbidité est réalisée à 600 nm par spectrophotométrie sur un lecteur de plaques. Les valeurs d'absorbance sont rapportées à la concentration en acide hyaluronique selon l'équation de droite d'étalonnage suivante (Oueslati et al., 2014).

$$[AH] = (DO - 0,02) / 0,45$$

La gamme étalon a été préparée par solubilisation d'AH en tampon phosphate 0,1 M à pH 7, à des concentrations allant de 0 à 1 g/L.

Remarque : la taille moléculaire de l'AH n'a pas d'influence sur l'équation de la droite [AH] = f(DO).

7.4.3. Caractérisation de l'AH

Contrairement aux méthodes de chromatographie d'affinité tel que la CLHP, le principal phénomène physique permettant la séparation des différentes macromolécules en solution n'est pas basée sur l'affinité chimique avec le support, mais idéalement sur la taille des molécules en solution ou plus précisément leur volume hydrodynamique (Figure 4).

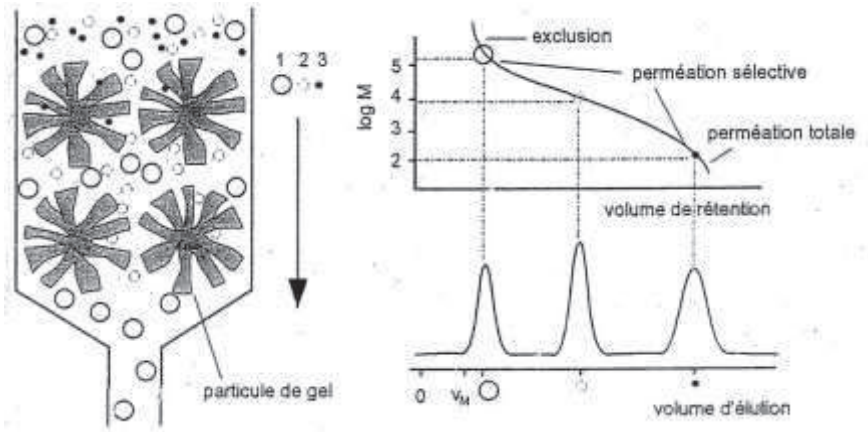


Figure 4. Principe de la chromatographie d'exclusion stérique.

7.4.3.1. Préparation des échantillons par précipitation à l'éthanol

Les échantillons à analyser en chromatographie d'exclusion stérique sont préalablement précipités à l'éthanol dans le but d'éliminer la majeure partie des contaminants. Après élimination des cellules par centrifugation (15000 g, 20 mn), le surnageant est récupéré. Le pH du surnageant est ajusté à 2 à l'aide d'une solution d'H_2SO_4 à 5 M puis deux volumes d'éthanol à 96% sont ajoutés. La suspension est ensuite mise à agiter pendant deux heures à température ambiante et centrifugée à 3000 g pendant 30 mn afin de remettre en suspension le culot d'acide hyaluronique en tampon phosphate salin(PBS) à pH 7,4.

7.4.3.2. Chromatographie d'exclusion stérique

Les propriétés moléculaires de l'AH (masse molaire, rayon hydrodynamique, viscosité intrinsèque) sont déterminées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) appelée aussi chromatographie sur gel perméable (GPC). Les échantillons préalablement préparés (paragraphe 7.4.3.1) sont dilués afin de ne pas dépasser la concentration seuil de 0,5 g/L. La chaîne GPCmax Viscotek utilisée comprend une pompe délivrant un débit constant de tampon PBS (pH 7,4) à 0,35 mL / min, un dégazeur et un passeur automatique (volume d'injection de 50 µL). La séparation se fait sur colonnes ViscoGEL A7000 et A6000M couplées à une colonne de garde. Le tout est thermostaté à 35°C. La détection se fait à l'aide d'un système de multi-détection qui se compose de quatre types de détecteurs :

- un réfractomètre différentiel (calcul de la concentration massique)
- un viscosimètre (calcul de la viscosité intrinsèque)
- un détecteur de diffusion de la lumière orthogonal (90 °C) pour déterminer la taille de molécules de rayon de giration inférieur à 15 nm (diffusion isotrope)
- un détecteur de diffusion de la lumière aux faibles angles (7°C) pour la détermination de la taille de molécules qui, comme l'AH, ont un rayon de giration supérieur à 15 nm (diffusion anisotrope). Le calcul se fait selon l'équation suivante :

$$R(\theta) = K.(\frac{d_n}{d_c})^2.C.M_w$$

avec R(θ) signal mesuré par la diffusion de la lumière aux faibles angles, K constante instrumentale, dn / dc l'incrément d'indice de réfraction spécifique (0,147 mL/g pour l'acide hyaluronique en tampon PBS), C la concentration et Mw la masse molaire moyenne en Dalton (Da).

Les standards utilisés pour l'étalonnage sont l'oxyde de polyéthylène(PEO) et le dextrane. Une calibration systématique sur le standard PEO puis une vérification de taille sur le dextrane permet de traiter ensuite les résultats à l'aide du logiciel OmniSec.

7.4.3.3. Mesure de la viscosité dynamique par rhéomètrie

7.4.3.3.1. Détermination de la viscosité dynamique

Les propriétés rhéologiques de l'AH produit et relargué dans le milieu de culture sont déterminées par rhéomètrie. Un volume de 2 mL environ d'échantillon brut de culture bactérienne est utilisé pour chaque mesure de viscosimètrie. L'analyse se fait via un système cône / plan. Le module conique de 2°d'inclinaison et 50 mm de diamètre. Il est couplé à un module plan de 65 mm de diamètre (Figure 5). Les analyses sont effectuées à température de culture bactérienne à savoir 37°C. Les premiers essais ont été mis en œuvre sur une large gamme de taux de cisaillement (entre 10^{-2} et 1000 s^{-1}) afin de simplifier les conditions opératoires par la suite (Figure 6). Les résultats de viscosité dynamique sont exprimés en fonction du taux de cisaillement. L'acquisition et l'analyse des résultats se fait via le logiciel rSpace.

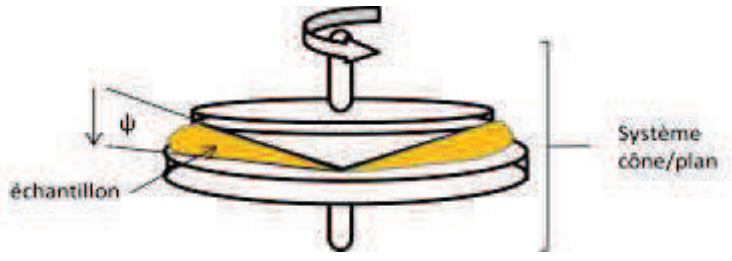


Figure 5. Schéma du procédé de mesure viscosimétrique dans le cas d'un système de modules cône/plan. La flèche indique que le module conique supérieur est en rotation continue (sous air comprimé pour éviter tout frottement) lors de la mesure.

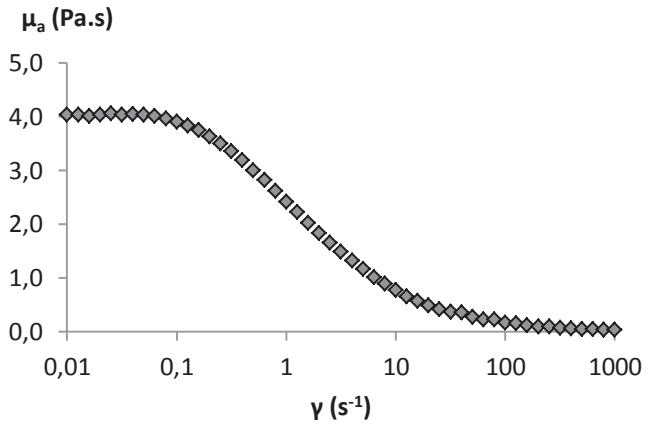


Figure 6. Profil rhéofluidifiant d'un échantillon de fin de culture microbienne. La viscosité dynamique est ici représentée en fonction d'une large gamme de taux de cisaillement.

7.4.3.3.2. Mesure du transfert d'oxygène théorique dans le cas d'un fluide non Newtonien

La méthode de calcul est détaillée dans la partie I : Etude Bibliographique.

8. Planification expérimentale

Dans notre cas, la planification expérimentale est appliquée en utilisant la méthode de surface de réponse (MSR). A la différence de la méthode de criblage qui permet de déterminer les facteurs qui ont une influence statique significative sur les variations d'une réponse, la méthode des surfaces de réponse va nous permettre de quantifier et de représenter géométriquement ces réponses en fonction de variables continues préalablement définies comme influentes. La méthode permet alors de décrire l'évolution de ces réponses en tenant compte des interactions entre ses facteurs. Les informations obtenues vont se présenter sous forme de surfaces de réponse qui délimitent les zones optimales pour les réponses étudiées. La modélisation est réalisée via des plans de type composites à faces centrées (Figure 7), selon une équation de type quadratique.

Différents plans composites à faces centrées sont mis en place dans ces travaux : 3 facteurs, 3 niveaux (Figure 7) ou 2 facteurs, 3 niveaux. Sur un modèle complet de base « 3 facteurs, 3 niveaux » qui imposerait 27 expériences sans considérer les réplicats (ou points centraux du système), le logiciel de modélisation nous permet de réduire de manière significative le nombre d'expériences à 17 au total.

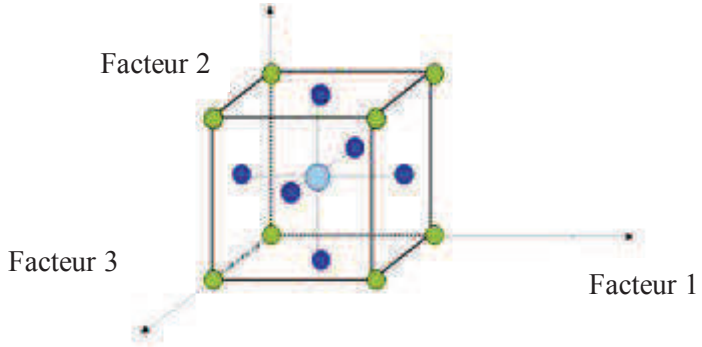


Figure 7. Exemple d'un plan composite à faces centrées (3 facteurs, 3 niveaux) dans laquelle les points verts représentent les points du plan factoriel ([-1 ; -1 ; -1], [-1 ; +1 ; -1],...),ceux en bleu foncé correspondent aux points en étoile ([0 ; -1 ; -1], [-1 ; 0, +1]...) et où le point bleu clair est le centre du domaine ([0; 0; 0]), qui est répété 3 fois afin de vérifier la fiabilité du système (erreur expérimentale).

La définition du plan d'expériences ainsi que sa résolution sont assistées par le logiciel MODDE 9.

9. Interprétation des résultats

9.1.1. Calcul de vitesses spécifiques

Le bilan de matière pour un système défini est le suivant :

ENTREE + PRODUCTION → SORTIE + CONSOMMATION + VARIATION INTERNE

Dans le cas de cultures en discontinu, les termes d'entrée et de sortie sont nuls. On obtient donc :

- pour la biomasse $0 + r_x . V = 0 + \frac{d(XV)}{dt}$
- pour le substrat $0 - r_S . V = 0 + \frac{d(SV)}{dt}$
- pour les produits $0 + r_P . V = 0 + \frac{d(PV)}{dt}$

avec V le volume de culture (en L), X, S et P la concentration en biomasse, en substrat et en produit (en g/L) et t le temps (en h).

r_x, r_s et r_p représentent respectivement les vitesses volumiques de croissance, de consommation de substrats et de production (en g/L.h) et sont calculées en rapportant au temps les concentrations (en g/L) consommées ou produites à chaque temps t. Ainsi les vitesses spécifiques de consommation et de production peuvent être calculées en rapportant ces vitesses volumiques à la production de biomasse. Elles s'expriment ainsi en grammes de substrat, de biomasse ou de produit par gramme de biomasse et par heure (g/g(X).h).

- taux de croissance : $\mu = \frac{r_x}{X}$
- vitesse spécifique de consommation de substrat : $\eta = \frac{r_s}{X}$
- vitesse spécifique de formation des produits : $\pi = \frac{r_p}{X}$

9.1.2. Calcul de rendements

Les rendements (Y) sont calculés en rapportant les concentrations de produit formé par gramme de substrats (rendement de produit, $Y_{P/S}$), de biomasse formée par gramme de substrat (rendement de biomasse, $Y_{X/S}$) ou de produit formé par gramme de biomasse (production spécifique ou par abus et simplification de langage dans ce mémoire « rendement » produit sur biomasse, $Y_{P/X}$).

9.1.3. Taux de recouvrements carbonés

Le devenir du nutriment élémentaire « carbone » est effectué par calcul du recouvrement carboné. Celui-ci est réalisé par une simple détermination du pourcentage de carbone issu du« substrat glucose » et de celui retrouvé au niveau des différents produits issus du catabolisme et de l'anabolisme (acétate et CO_2 associé, lactate, biomasse, AH …).

Document confidentiel

RESULTATS ET DISCUSSION

Document confidentiel

Chapitre I

Développement des méthodes analytiques

Document confidentiel

SOMMAIRE - RESULTATS CHAPITRE I

1. INTRODUCTION 74

2. MISE AU POINT D'UNE METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE 77

2.1. ETUDE PREALABLE : ABSORBANCE DE L'AH CAPSULAIRE RESIDUEL EN SPECTROPHOTOMETRIE 77

2.2. DEFINITION DES DROITES DE QUANTIFICATION DE LA BIOMASSE EN FONCTION DE L'ABSORBANCE 78

2.2.1. Longueur d'onde de mesure 78

2.2.2. Pentes obtenues 80

2.2.3. Corrélation entre la biomasse cellulaire en g/L et l'absorbance 81

3. METHODES DE SELECTION DE SOUCHES NON HEMOLYTIQUES ET HYALURONIDASE NEGATIVES. 84

4. STABILITE DE LA TAILLE MOLECULAIRE ET DE LA CONCENTRATION DE L'AH MICROBIEN DANS LE MILIEU DE CULTURE APRES STOCKAGE 87

5. CONCLUSION 90

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Extraction de l'AH de la capsule d'AH par traitement au SDS. Le traitement a été évalué pour quatre cultures (A) et la moyenne a été réalisée (B). 75

Figure 2. Spectres d'absorption de l'AH (A : 0,5 MDa et B : 4,1 MDa) en tampon phosphate entre 200 et 800 nm. Les gammes de concentrations vont de 0,1 à 5 g/L. 78

Figure 3. Courbes de calibration des mesures d'absorbance en fonction de comptages manuels à différentes longueurs d'onde pour la souche de Streptococcus zooepidemicus 11053. 79

Figure 4. Courbes de calibration de l'absorbance en fonction du comptage cellulaire à 600 nm avec différentes souches de Streptococcus zooepidemicus. 80

Figure 5. Révélation de l'activité hyaluronidase par la méthode sur gélose à AH inclut. A gauche : méthode de révélation au bleu d'Alcian sur gélose d'AH. Quatre concentrations en hyaluronidase testées. A droite : méthode de révélation à l'acide acétique sur gélose d'AH. Quatre concentrations en hyaluronidase testées. 85

Figure 6. Révélation de l'activité hyaluronidase par la méthode sur gélose à AH inclut. A gauche : méthode de révélation au CTAB. Révélation 15 mn à 37 °C. A droite : méthode de révélation au CTAB, Révélation 30 min à 37 °C. 86

Figure 7. Révélation de l'activité hyaluronidase par la méthode sur gélose à AH inclut. A gauche : méthode de révélation au CTAB. Révélation 6h à 37 °C. Hyaluronidase 4 U/ mL + témoins négatifs. A droite : révélation au CTAB 6 h à 37 °C avec a, b et c correspondant à

des surnageants de culture de 24 h en milieu BHI-B 20 g/L de glucose, en fioles d'Erlenmeyer. Avec a, souche TDF1 ; b, souche ATCC 6580, c souche 1006.2.....87

Figure 8. Evolution de la taille moléculaire de l'AH microbien pour des solutions comprises entre 0,5 et 3 MDa (données fournisseur). 88

Figure 9. Evolution de la concentration en AH microbien dans des solutions allant de 0,25 à 2 g/L.....89

Figure 10. Chromatogrammes en exclusion de taille d'une solution d'AH à 1g/L ayant ou non été congelée à -20°C pendant une semaine. Les signaux réfractométrie (concentration en AH) ainsi que la réparation des tailles moléculaires dans l'échantillon sont représentées.....90

Figure 11. Résumé des méthodes analytiques importantes mises en œuvre pour un suivi complet de la physiologie et du métabolisme de Streptococcus zooepidemicus au cours de cinétiques microbiennes.....91

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Pentes, gammes de linéarité et coefficients de corrélation relatifs aux données de la Figure 3.....80

Tableau 2. Caractéristiques des courbes de calibrations et écart-types correspondants relatifs à la Figure 4.....80

Tableau 3. Valeurs de E (E-value score) et pourcentage de recouvrement de séquence pour les organismes non capsulés génétiquement les plus proches de Streptococcus zooepidemicus (Blast). 82

CHAPITRE I : MISE AU POINT ET ADAPTATION DES METHODES ANALYTIQUES

1. Introduction

Cette étape de développement des méthodes analytiques est d'une importance majeure puisqu'elle intervient dans l'ensemble du processus d'étude et de développement du procédé de production d'AH par voie microbienne.

En effet, dans le cadre d'une étude complète autour du métabolisme de biosynthèse de l'AH, il était important de s'attacher à développer des méthodes de suivi des caractéristiques technologiques des souches utilisées (hémolyse, production de hyaluronidase, production d'AH) mais aussi d'étudier tous les apports (entrées) et toutes autres productions (sorties) possibles au niveau de la cellule. Les substrats apportés à la cellule, dans notre cas, ont pour but de produire de la biomasse, de l'AH et d'autres produits du métabolisme central lié au métabolisme lactique des bactéries utilisées (lactate, acétate…). Au vu de ces nombreuses « entrées et sorties », il apparaissait important de maîtriser les méthodes de quantification de chacune d'elles afin de pouvoir moduler efficacement les conditions opératoires ainsi que suivre leur impact sur les performances du procédé de production.

Certaines méthodes sont très bien renseignées dans la littérature mais n'étaient pas forcément utilisées au sein du laboratoire, tandis que d'autres méthodes ont nécessité la mise en place d'études plus poussées afin d'assurer un suivi cinétique fiable. En résumé, il était indispensable de développer des méthodes permettant :

- de quantifier et caractériser l'AH au cours de la production,

- de déterminer, chez la souche microbienne, un bilan cinétique et métabolique complet,

- de développer des méthodes de sélection de souches bactériennes d'intérêt industriel.

En outre, une étude amont, liée à la stabilité des échantillons de culture bactérienne après conservation à -20 °C, a été également mise en œuvre de façon à déterminer les conditions de mise en œuvre les plus performantes des différentes méthodes de dosage retenues.

Document confidentiel

Dosage et caractérisation de l'AH (thèse N.Oueslati, 2014)

Une méthode de dosage de l'AH au bromure de cétyl-triméthyl ammonium (CTAB) a pu être « optimisée » pour assurer un suivi cinétique spécifique, simple et rapide de la concentration en AH et permettant de s'affranchir de la méthode de dosage au carbazole, plus contraignante et moins sensible (Bitter et Muir, 1962). Enfin, pour évaluer qualitativement l'AH produit, une méthode de caractérisation des tailles d'AH produites et de leur distribution a été également mise en place par chromatographie de perméation sur gel (GPC).

L'AH produit par *Streptococcus zooepidemicus* se retrouve au niveau de deux localisations. Une partie est retrouvée au niveau capsulaire (AH formant encore une gaine autour de la cellule bactérienne) et l'autre en solution (AH libre relargué dans le milieu de culture). Des études préalables réalisées de front avec celles d'une autre thèse (Nadia Oueslati, 2014) ont permis de montrer que la quantité d'AH capsulaire en fin de fermentation était négligeable.

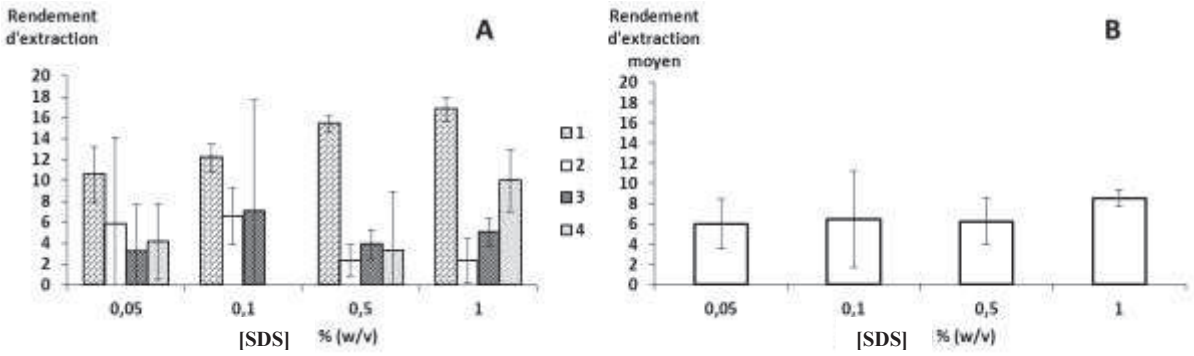


Figure 1. Extraction de l'AH de la capsule d'AH par traitement au SDS. Le traitement a été évalué pour quatre cultures (A) et la moyenne a été réalisée (B).

Les résultats présentés dans la Figure 1 montrent qu'une fraction capsulaire reste disponible en fin de fermentation. Des dosages avant et après extraction au SDS ont permis d'estimer la fraction capsulaire autour de 8 % en moyenne. Cette faible fraction d'AH retrouvée ne justifie pas de mettre en place un protocole d'extraction systématique avant dosage de l'exopolysaccharide en solution. De plus, ces résultats sont cohérents avec l'étude réalisée par Goh (1998). Elle démontrait que pour une extraction totale à 0,1 % de dodécylsulfate de sodium (SDS), l'AH récupéré par l'extraction correspondait au maximum à 20 % de l'AH total. En conséquence de ces résultats et par souci pratique, nous nous sommes focalisés sur le dosage de l'AH libre.

Biomasse

Au regard de l'état de l'art concernant les méthodes de suivi de la croissance bactérienne chez *Streptococcus zooepidemicus*, un biais a pu être constaté. En effet, les méthodes de dosage de la biomasse usuellement retrouvées ne prennent pas en considération la fraction capsulaire d'AH dans leurs mesures de matière sèche. Une étude complète de quantification de la biomasse par spectrophotométrie a donc été engagée.

Substrats et produits du métabolisme

La méthode de définition et de quantification des substrats consommés et des produits formés, par chromatographie liquide haute performance (partie II - Matériel et Méthode), a nécessité quelques modifications mineures. Celles-ci, tiennent compte de phénomènes de colmatage intempestifs liés au relargage, dans le surnageant de culture, d'acide hyaluronique de haute taille moléculaire à concentration élevée. Cette méthode permet d'avoir une vue d'ensemble assez précise quant au devenir du carbone au cours de la culture microbienne.

Mutagenèse et criblage

L'utilisation de souches bactériennes à des fins industrielles impliquait un respect de normes de sécurité évidentes (perte de l'activité hémolytique chez les souches productrices) ainsi que l'assurance d'une stabilité des caractéristiques de production d'AH chez ces souches (étude quant à la production potentielle de hyaluronidases chez *Streptococcus zooepidemicus*). Ces pré-requis ont nécessité de mettre en place des méthodes de criblage rapides et efficaces. La mutagénèse aléatoire a été préférée à une mutagénèse dirigée. Le développement de la méthode se concentrera sur l'importance d'adapter de manière spécifique des protocoles de mutagénèse et de criblage connus au couple *Streptococcus zooepidemicus* / agent mutagène.

Document confidentiel

2. Mise au point d'une méthode spectrophotométrique de quantification de la biomasse

Cette étude repose sur une hypothèse de départ simple : **est-ce que le traitement au SDS, appliqué aux cellules pour libérer l'AH capsulaire, est efficace à 100 % ?** De telles vérifications auraient nécessité en premier lieu la mise en place de moyens lourds et chronophages (microscopie électronique à balayage). Une problématique annexe peut être soulevée quant à l'interférence de l'AH avec la mesure spectrophotométrique.

L'objectif ici est donc de disposer d'une méthode rapide et fiable d'évaluation de la biomasse par spectrophotométrie en corrélation éventuelle avec des mesures de matière sèche et des comptages manuels.

Une solution, fondée sur une démarche méthodologique raisonnée a été trouvée. Partant de l'hypothèse initiale qu'il reste potentiellement de l'AH résiduel autour des cellules de *Streptococcus zooepidemicus* nous avons cherché :

- à évaluer l'impact que cela aurait sur une mesure d'absorbance par spectrophotométrie,
- à corréler une mesure d'absorbance à des comptages manuels répétés,
- à corréler cette même mesure d'absorbance à une matière sèche. Pour cela nous avons estimé la masse d'une cellule de *Streptococcus zooepidemicus* entièrement dépourvue de sa capsule en recherchant un modèle d'étude génétiquement le plus proche.

2.1. Etude préalable : absorbance de l'AH capsulaire résiduel en spectrophotométrie

L'évaluation de la capacité d'absorbance de l'AH en solution a été réalisée sur des tailles moléculaires de 0,5, 1,5, 3 et 4,1 MDa (données fournisseur). Les solutions sont préparées en tampon phosphate sur une large gamme de concentrations (0,1 à 5 g/L). Le choix de standardiser le protocole de mesure sur une base de tampon phosphate a permis de se dispenser d'un renouvellement de cette étude et de celles qui en découlent pour chaque nouveau milieu de culture utilisé (modifications récurrentes des milieux de culture au cours de ces travaux de thèse). Les spectres d'absorbance ont été établis entre 200 et 800 nm.

Il est supposé que l'AH puisse interférer dans la mesure d'absorbance pour la quantification de la biomasse chez *Streptococcus zooepidemicus* (Goh, 1998).

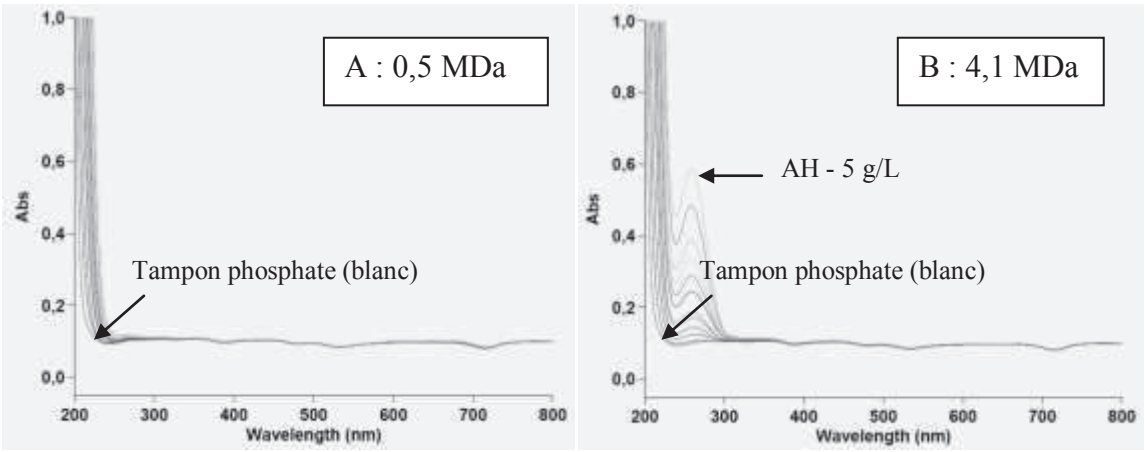


Figure 2. Spectres d'absorption de l'AH (A : 0,5 MDa et B : 4,1 MDa) en tampon phosphate entre 200 et 800 nm. Les gammes de concentrations vont de 0,1 à 5 g/L.

Les résultats présentés dans la Figure 2 montrent clairement que, quelle que soit la concentration ou la taille moléculaire, l'AH n'absorbe pas dans une large gamme de longueurs d'onde (entre 300 nm à 800 nm). Des résultats similaires sont obtenus avec les tailles intermédiaires (spectres non présentés). La différence d'absorbance à 260 nm (acides nucléiques) entre les gammes de taille de 0,5 MDa et 4,1 MDa peut s'expliquer par une différence de pureté entre les deux produits (pics non observables sur l'AH de 1,5 et 3 MDa). En effet, l'intensité des pics est, pour cette longueur d'onde, concentration dépendante.

Nous pouvons conclure de ces premiers résultats qu'une longueur d'onde de travail peut être définie entre 400 à 800 nm, sans risque d'interférence liée à l'absorbance de l'AH.

2.2. Définition des droites de quantification de la biomasse en fonction de l'absorbance

2.2.1. Longueur d'onde de mesure

Après avoir confirmé que l'AH n'interférait pas avec la mesure de la DO, il a été possible d'engager une étude sur la détermination d'une longueur d'onde opérationnelle.

Les longueurs d'onde de travail ont été choisies en fonction de valeurs communément retrouvées dans la littérature (530 nm (Armstrong et al., 1997 ; Penney et al., 2002), 600 nm (Lai et al., 2011), 660 nm (Huang et al., 2006 ; Liu et al., 2008) et 700 nm (Vazquez et al., 2009)). Seules les souches isolées au laboratoire 10053, 10062, 11048, TDF1 et la souche de référence ATCC6580 de *Streptococcus zooepidemicus* ont pu être utilisées comme modèles d'étude (problèmes de dénombrement manuel soulevés avec les souches « floc »), et ce, dans le but de déterminer les droites d'étalonnage de mesure de l'absorbance en fonction de comptages manuels sur cellule de Thoma.

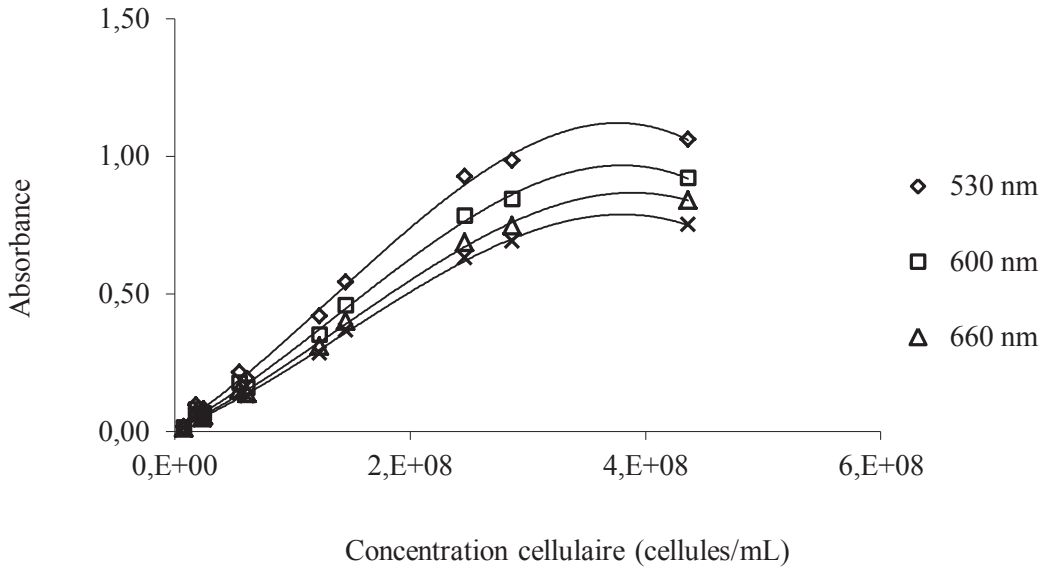


Figure 3. Courbes de calibration des mesures d'absorbance en fonction de comptages manuels à différentes longueurs d'onde pour la souche de Streptococcus zooepidemicus *11053.*

La Figure 3 exprime les résultats d'absorbance en fonction de comptages manuels obtenus pour la souche 11053 aux quatre longueurs d'étude. Les pentes, déterminées pour les zones linéaires de chaque courbe, sont sensiblement différentes en fonction de la longueur d'onde de mesure. Les coefficients de corrélation pour chaque cas sont satisfaisants (Tableau 1). Des résultats similaires ont été obtenus avec les différentes souches disponibles (données non présentées).

Tableau 1. Pentes, gammes de linéarité et coefficients de corrélation relatifs aux données de la Figure 3.

λ (nm)	Pente (UDO/C.mL^{-1})	r²	Gamme de linéarité (abs)
530	$3{,}8.10^{-9}$	0,994	0,92
600	$3{,}2.10^{-9}$	0,994	0,78
660	$2{,}8.10^{-9}$	0,994	0,68
700	$2{,}6.10^{-9}$	0,995	0,63

Le choix de réaliser les mesures à la longueur d'onde de 600 nm a été fait sur la base d'un compromis. En effet, les résultats à cette longueur d'onde sont les plus reproductibles sur le temps en complément d'un coefficient de corrélation correct (supérieur à 99 %) et d'une gamme de linéarité assez large (jusqu'à 0,78 en unité de densité optique).

2.2.2. Pentes obtenues

Avec l'appui de ces résultats, nous nous sommes attachés à définir les équations des courbes d'étalonnage à 600 nm (Absorbance = f(concentration cellulaire)) pour chaque souche étudiée.

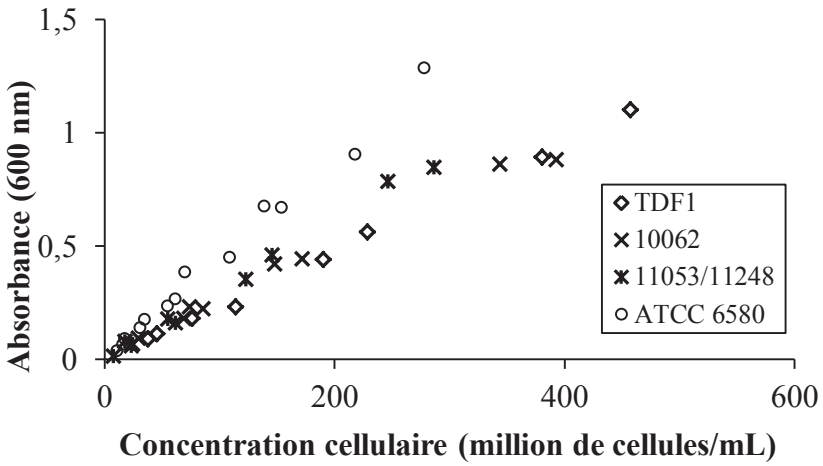


Figure 4. Courbes de calibration de l'absorbance en fonction du comptage cellulaire à 600 nm avec différentes souches de Streptococcus zooepidemicus.

Tableau 2. Caractéristiques des courbes de calibrations et écart-types correspondants relatifs à la Figure 4.

Souche	Pente (UDO/C.mL^{-1})	Ordonnée à l'origine	Ecart-type (%)	Gamme de linéarité (abs)
ATCC 6580	$4{,}5.10^{-9}$	$6{,}85.10^{-3}$	4,4	1,3
11248/11053	$3{,}2.10^{-9}$	$1{,}09.10^{-2}$	2,9	0,84
10062	$2{,}3.10^{-9}$	$3{,}54.10^{-2}$	4,2	0,88
TDF1	$2{,}4.10^{-9}$	$1{,}13.10^{-2}$	3,3	1,1

Comme le montrent la Figure 4 et le Tableau 2, plusieurs mesures ont été réalisées au cours du temps (durées de culture différentes, plusieurs cultures différentes) et une bonne linéarité est observée. Les écarts-types sont inférieurs à 5% et donc satisfaisants pour ce type de mesure.

Ces résultats soulignent la faisabilité de cette méthode de quantification de la biomasse et donc la possibilité de définir une concentration en cellules par mL fiable à partir d'une simple mesure spectrophotométrique à 600 nm.

De plus, une courbe standard unique (tampon phosphate) est ainsi définie pour chaque souche, quel que soit le milieu de culture utilisé initialement. En outre, la différence notable intra-espèce est un point important. Elle suggère que les équations-standard (pente, gamme de linéarité) sont souche dépendantes et ne peuvent ainsi être généralisées au sein de l'espèce considérée.

2.2.3. Corrélation entre la biomasse cellulaire en g/L et l'absorbance

Dans le principe, une mesure fiable de DO relative au nombre de cellules en suspension est désormais réalisable. En complément, il a été démontré que cette mesure n'interférait pas avec l'AH résiduel pouvant se maintenir au niveau capsulaire. L'obtention d'une nouvelle information relative à la masse d'une cellule seule dépourvue de sa gaine pourrait nous permettre d'accéder par mesure spectrophotométrique à la concentration cellulaire en g/L hors AH capsulaire.

L'objectif de cette étude est donc de tirer, à partir de la mesure par spectrophotométrie, une information relative à la matière sèche bactérienne, en g/L. Cette matière sèche devrait

idéalement être représentative de la masse cellulaire sans tenir compte de la capsule d'acide hyaluronique. À cette fin, nous avons cherché :

- à identifier les espèces de Streptocoques proches de *zooepidemicus*, mais dépourvues de capsule exocellulaire, en se basant sur les caractéristiques génétiques se rapprochant le plus de celles de notre modèle biologique,
- à définir la masse spécifique de cette bactérie modèle par de simples mesures de matière sèche.

Recherche d'une souche modèle

Un alignement de séquences nucléotidiques et une recherche de similitude (megablast) a été effectuée par le biais du site du NCBI afin de confronter une séquence consensus de 1419 paires de bases (ARN 16S d'une souche ATCC de *Streptococcus zooepidemicus*- Numéro d'enregistrement: NR_036756.1) à la base de données GenBank (matrice consensus). Un score limite de 95 % est fixé (pourcentage de paires de nucléotides appariés) ainsi qu'un recouvrement des séquences minimal de 95 % (pourcentage total de la séquence consensus alignée avec la séquence homologue trouvée). La pertinence de l'alignement est basée sur la « E-value ». Une E-value infinitésimalement proche de 0 signifiera qu'il est hautement improbable que l'alignement des séquences soit fortuit. Les résultats résumés dans le Tableau 3 montrent que les deux souches non encapsulées les plus proches de la séquence soumise appartiennent à l'espèce *Streptococcus thermophilus*.

Tableau 3. Valeurs de E (E-value score) et pourcentage de recouvrement de séquence pour les organismes non capsulés génétiquement les plus proches de Streptococcus zooepidemicus *(Blast).*

Souche	Numéro d'enregistrement	E-value	Recouvrement des séquences	Score
S. thermophilus MN-ZLW-002	NR_074827.1	0	97 %	1342/1419 (95 %)
S. thermophilus ATCC 19258	NR_042778.1	0	97 %	1342/1419 (95 %)

Détermination de la matière sèche cellulaire

Plusieurs mesures de matière sèche (durées de culture différentes, cultures répétées, volumes filtrés variables) ont été effectuées pour estimer la masse moyenne réelle d'une cellule de *S. thermophilus* par comparaison avec des comptages manuels sur cellule de Thoma. Les résultats donnent une moyenne de $6{,}9.10^{-10}$ mg par cellule, indépendamment du stade de développement cellulaire avec un écart-type proche de 10 %. Ce résultat peut nous conduire à penser qu'une cellule de *Streptococcus zooepidemicus* dépourvue de sa capsule pourrait peser près de 690 femtogrammes (fg). Considérant que la masse moyenne de *Streptococcus faecalis* a été définie autour de 250 fg (Heller et al., 1980) et que une cellule bactérienne de *E. coli* de dimensions comparables peut peser entre 100 et 1000 fg (Loferer-Krossbacher et al., 1998), nous pouvons observer que nos résultats sont du même ordre de grandeur que les données disponibles dans la littérature. Par conséquent, nous utiliserons cette valeur de 690 fg/cellule pour déterminer les masses sèches de cellules, sans acide hyaluronique associé, à partir de mesures spectrophotométriques pour la suite de ce travail.

Différentes méthodes de quantification de la biomasse chez des souches de *Streptococcus zooepidemicus* productrices d'AH sont couramment indiquées dans la littérature. Par exemple, Jagannath et al. (2010), proposent une mesure de la biomasse après traitement au SDS afin d'éliminer la capsule d'AH. Plus généralement, l'absorbance est mesurée directement à partir du milieu de culture cellulaire à des longueurs d'onde variables. Dans cette étude, nous avons proposé une méthodologie simple, rapide et précise permettant de se dispenser de toute interférence liée au milieu de culture avec une mesure effectuée dans un tampon spécifique. Nous avons également pu démontrer que l'AH n'absorbe pas dans une large gamme de longueurs d'onde (de 400 à 800 nm) rendant les mesures spectrophotométriques possibles pour la **détermination d'une concentration en cellules/mL**. Parallèlement, la possibilité d'estimer la valeur de la masse d'une souche non encapsulée de *Streptococcus zooepidemicus* nous a permis **d'estimer avec précision la concentration de la biomasse en g/L** qui serait uniquement imputable à des cellules dépourvues de capsule d'AH.

3. Méthodes de sélection de souches non hémolytiques et hyaluronidase négatives.

L'utilisation de souches bactériennes dans un cadre industriel impose le respect de certaines normes et règles de sécurité. La perte de l'activité hémolytique de *Streptococcus zooepidemicus* mais aussi de son activité hyaluronidase (problèmes de productivité) en font partie. De nombreuses études montrent que la méthode de sélection des souches non hémolytiques fonctionne parfaitement. Simple et rapide, la sélection est faite sur gélose et se base sur le principe que les souches non hémolytiques ne peuvent assurer l'hémolyse des globules rouges du sang (phénomène visible sur gélose additionnée de sang de mouton).

La sélection de souches hyaluronidase négatives représentait quant à elle un verrou à lever. Différentes méthodes sont retrouvées dans la littérature :

- la révélation sur géloses contenant de l'AH (Mc Manus et Mowry, 1960 ; Smith et al., 1968),
- les dosages colorimétriques basés sur la détection des résidus de N-acétyl-glucosamine après digestion enzymatique (Reissig et al., 1990),
- les dosages fluorimétriques basés sur le marquage de l'AH par un agent fluorescent tel que la 2-aminopyridine (Nakamura et al., 1990).

La première catégorie de méthodes semble être la plus à même de remplir les conditions de simplicité de mise en œuvre requises pour des analyses de routine.

Le but de cette étude est donc de mettre en place une sélection sur gélose simple et rapide. Le développement de cette méthode est réalisé, dans un premier temps, à partir de hyaluronidase (témoin positif dont nous connaissons le pouvoir de dégradation de l'AH) puis sera appliqué sur les cultures bactériennes. Les objectifs initiaux de cette étude devaient :

- définir un protocole de préparation des géloses contenant l'AH,
- définir un système d'inoculation de la gélose,
- définir un protocole de révélation efficace.

Afin de réduire le nombre d'essais pour cette étude nous avons recherché, dans un premier temps, la méthode de révélation la plus appropriée. Ainsi, les géloses sont préparées par

inclusion d'une solution d'AH stérile (filtrée) à une concentration finale de 0,4 g/L. L'inoculation de la hyaluronidase est réalisée sur disques imbibées stériles.

Une première méthode de révélation de l'activité enzymatique a été décrite par Mc Manus et Mowry en 1960. Elle propose de précipiter l'AH à l'aide d'une solution d'acide acétique 3 %. La présence de mucopolysaccharides (ou glycosaminoglycanes) sulfatés et non sulfatés (soit de l'AH non dégradé) est alors révélée par coloration au bleu d'Alcian (0,5 % (m/v)). Une autre méthode a été décrite par Smith et al. (1968) et propose, après incubation de géloses contenant de l'AH et de l'albumine, de les traiter 10 mn à l'acide acétique 2 N. L'AH non dégradé complexera avec l'albumine et sera précipité, laissant apparaître un trouble. En parallèle, un halo clair sera révélé dans les zones où il y a eu digestion enzymatique. Les résultats sont présentés dans la Figure 5 ci-après. Quatre concentrations différentes en hyaluronidase sont expérimentées. Les résultats présentés montrent que l'application de protocoles directement issus de la littérature ne permet pas de mettre en évidence une méthode fiable de révélation de l'activité hyaluronidasique sur boîte de Pétri et ce quelle que soit la concentration.

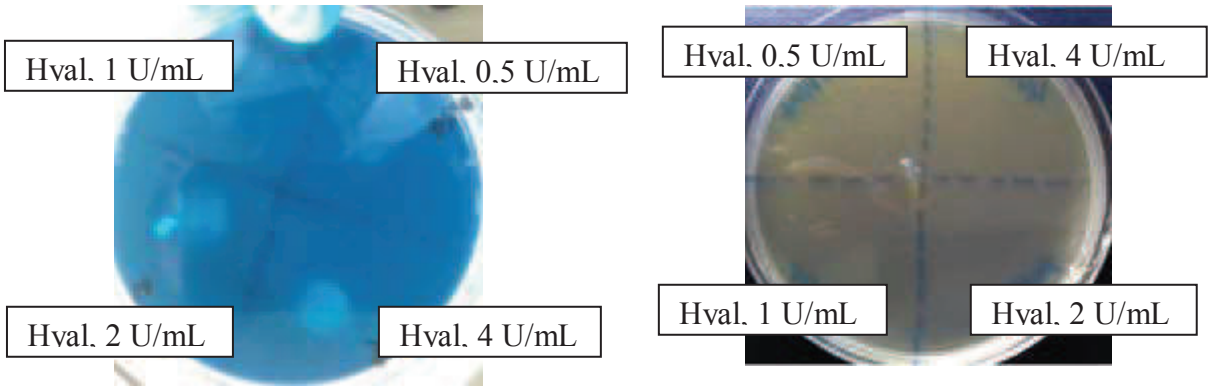


Figure 5. Révélation de l'activité hyaluronidase par la méthode sur gélose à AH inclut. A gauche : méthode de révélation au bleu d'Alcian sur gélose d'AH. Quatre concentrations en hyaluronidase testées. A droite : méthode de révélation à l'acide acétique sur gélose d'AH. Quatre concentrations en hyaluronidase testées.

Une méthode de révélation alternative a donc été proposée en exploitant la capacité du CTAB à réagir directement avec l'acide hyaluronique pour former un précipité (Oueslati et al., 2014). Le choix est ainsi fait de réaliser la réaction de révélation 37 °C. La concentration en CTAB a été augmentée d'un facteur 4. En effet, la révélation s'avérait impossible (données non présentées) avec une concentration en CTAB calquée sur le protocole de dosage (partie II - Matériel et Méthode). De plus, le choix d'inclure la hyaluronidase (témoin positif) ou

ultérieurement les surnageants de culture bactérienne, dans des puits, devrait permettre un meilleur accès à la gélose et donc une meilleure digestion enzymatique. Le protocole final retenu pour la révélation de l'activité hyaluronidase est décrit dans la partie Matériel et Méthodes. Les résultats sont présentés dans la Figure 6.

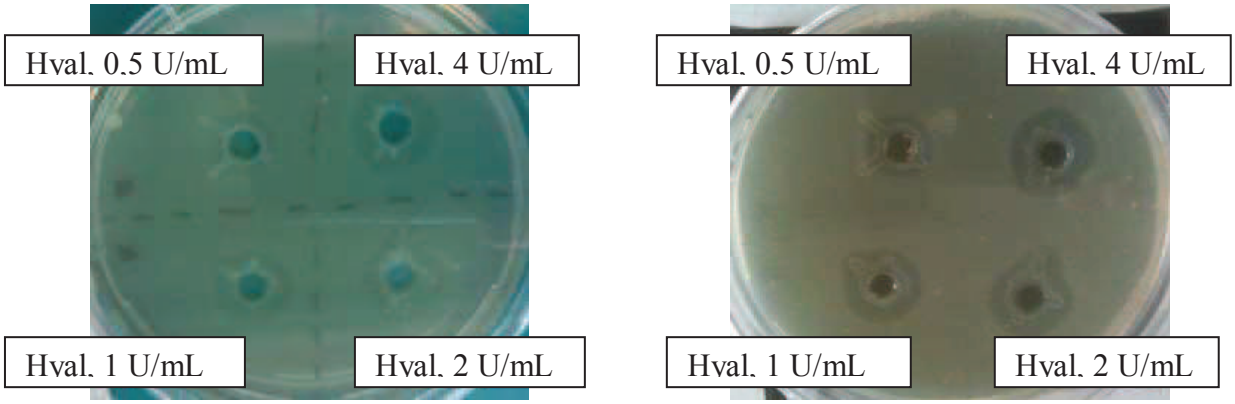


Figure 6. Révélation de l'activité hyaluronidase par la méthode sur gélose à AH inclut. A gauche : méthode de révélation au CTAB. Révélation 15 mn à 37 °C. A droite : méthode de révélation au CTAB, Révélation 30 min à 37 °C.

Les résultats mettent clairement en évidence, chez le témoin positif (hyaluronidase bactérienne), qu'il y a bien digestion enzymatique de la gélose d'AH. Une méthode simple de mise en œuvre et rapide, permettant la révélation de l'activité hyaluronidasique, a été développée. Cette technique de révélation originale peut ainsi être utilisée en mode cinétique sur des surnageants de culture en complément d'essais de vérification de l'activité hyaluronidase chez des souches mutées. Des essais sur des surnageants de culture bactérienne, concentrés par évaporation rotative sous vide ou non, ont, par la suite, été effectués. Le protocole validé au cours des essais précédents a été appliqué. Les résultats sont présentés dans la Figure 7.

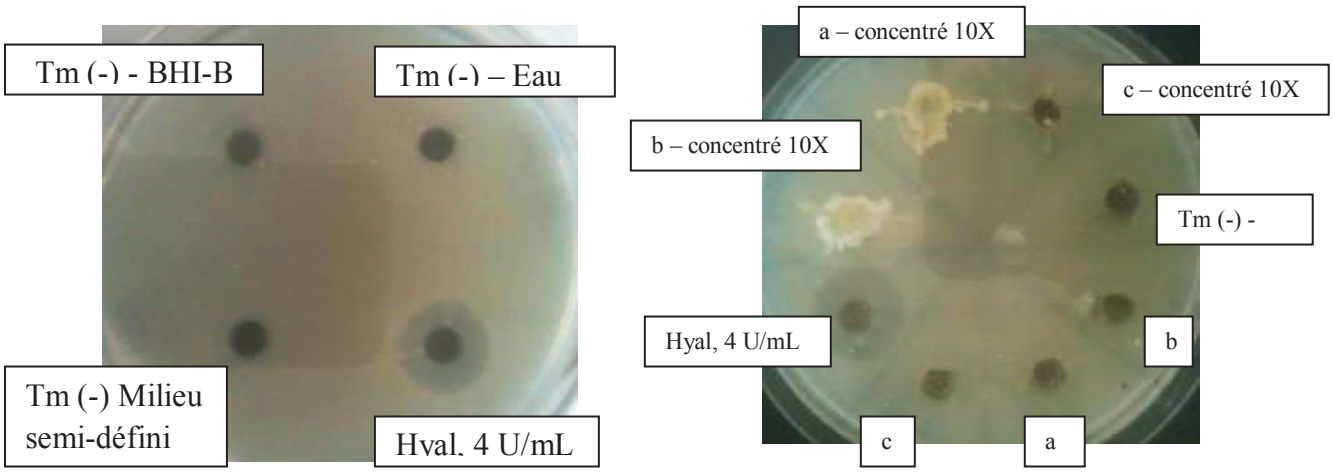


Figure 7. Révélation de l'activité hyaluronidase par la méthode sur gélose à AH inclut. A gauche : méthode de révélation au CTAB. Révélation 6h à 37 °C. Hyaluronidase 4 U/ mL + témoins négatifs. A droite : révélation au CTAB 6 h à 37 °C avec a, b et c correspondant à des surnageants de culture de 24 h en milieu BHI-B 20 g/L de glucose, en fioles d'Erlenmeyer. Avec a, souche TDF1 ; b, souche ATCC 6580, c souche 10062.

Les essais présentés ne permettent pas de déceler d'activité hyaluronidasique. Ainsi, cette activité est peut être inexistante chez ces souches et dans ces conditions de culture. Il est aussi possible que la méthode de révélation ne soit pas assez sensible pour des concentrations faibles. Néanmoins, la concentration témoin en hyaluronidase (4 U/mL) est assez faible pour prévoir un seuil de détection large. Cela pourrait ainsi signifier que la production de hyaluronidases ne serait pas favorisée dans de telles conditions de culture.

Au vu de la littérature (Mc Manus et Mowry, 2005 ; Smith et al., 1968) et des protocoles existants de dosages fluorimétriques (Nakamura et al., 1990) ou colorimétriques (Reissig et al., 1998), une méthode efficace, très simplifiée et rapide a pu être mise en place pour des essais de routine. La révélation de l'activité hyaluronidasique à un temps « t » au cours des cinétiques de production de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus* est donc envisageable.

4. Stabilité de la taille moléculaire et de la concentration de l'AH microbien dans le milieu de culture après stockage.

L'objectif de cette étude était de nous assurer que les conditions de stockage (-20 °C), appliquées sur les échantillons de culture microbienne après prélèvements, n'avaient pas d'effet notoire sur le maintien de la concentration et de la taille moléculaire du produit

d'intérêt. En effet, la sensibilité de l'AH à certaines conditions physico-chimiques extrêmes a pu être démontrée (Lowry et al., 1994).

Une large gamme de tailles moléculaires et de concentrations d'AH d'origine bactérienne (HTL, Javené, France) a été préparée. Les échantillons d'AH en solution tamponnée ont ensuite subi un traitement de conservation plus extrême que celui appliqué sur certains échantillons de culture en attente de traitement (-20 °C, 1 semaine au lieu de 48 h). Un suivi, avant et après traitement, de la concentration et de la taille moléculaire a été réalisé par séparation en GPC et détection de la diffusion de la lumière aux faibles angles. Un dosage complémentaire au CTAB (concentration) a été réalisé.

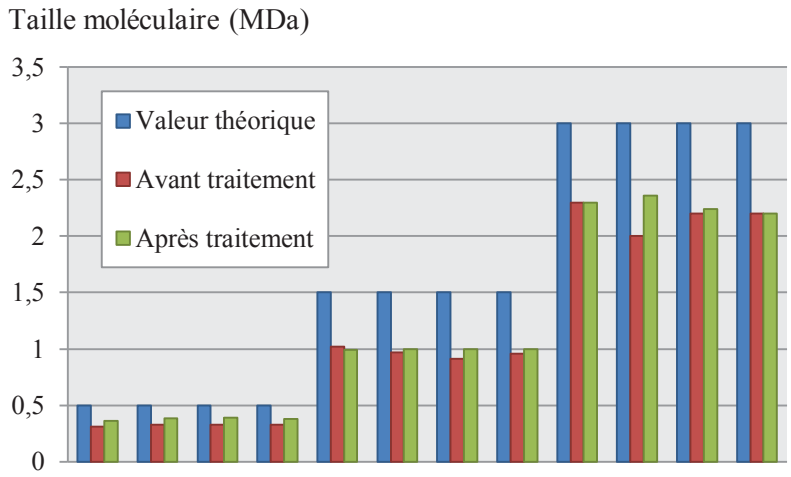


Figure 8. Evolution de la taille moléculaire de l'AH microbien pour des solutions comprises entre 0,5 et 3 MDa (données fournisseur).

Document confidentiel

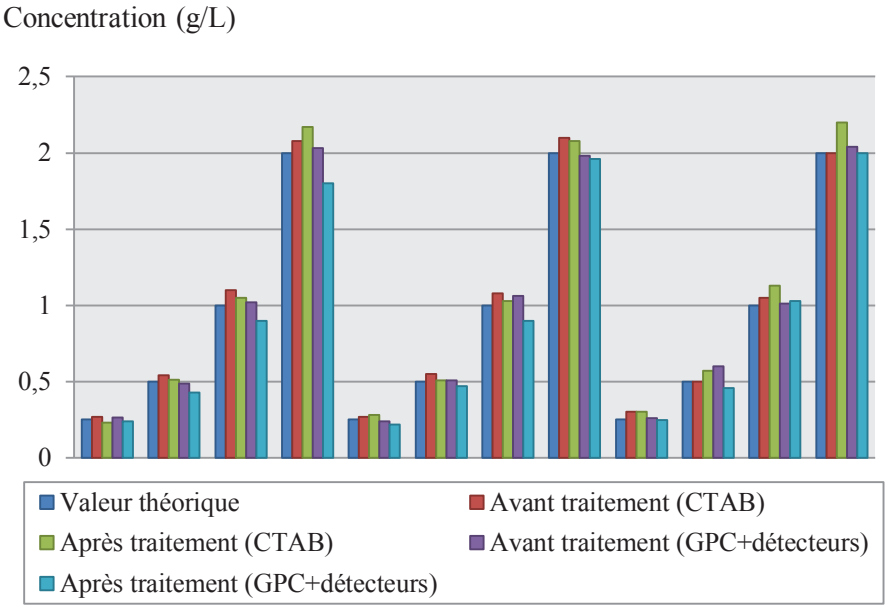


Figure 9. Evolution de la concentration en AH microbien dans des solutions allant de 0,25 à 2 g/L.

Différence entre valeurs théoriques et pratiques

Les résultats présentés dans les Figure 8 et Figure 9 montrent, dans un premier temps, qu'il existe une différence entre les tailles annoncées par le fournisseur de l'AH microbien et les mesures réalisées par chromatographie d'exclusion stérique et détection de la diffusion de la lumière aux faibles angles. Cet écart moyen de l'ordre de 30 % est non négligeable et pourrait être lié à une différence de la valeur du dn/dc utilisée par le fournisseur pour ses analyses. En effet, le dn/dc ou incrément d'indice de réfraction spécifique est propre à chaque solution. La valeur de dn/dc de 0,147 utilisée pour nos mesures a été calculé spécifiquement pour de l'AH microbien remis en suspension en tampon PBS.

Evolution de l'échantillon au cours du stockage

La tendance générale montre, qu'indépendamment de la taille et de la concentration initiales de l'AH microbien en solution, il n'y a pas de dégradation des chaînes du polysaccharide. De même, la concentration mesurée par réfractométrie ou dosée au CTAB avant et après traitement montre qu'il n'y a pas de modification significative liée à la congélation des échantillons à -20 °C.

Un exemple (1 g/L – 2 MDa) du profil chromatographique obtenu en GPC avant et après traitement est présenté ci-après (Figure 10). Nous pouvons observer que les signaux de réfraction de la lumière et la représentation de la répartition moyenne des tailles ne sont pas modifiés avant et après traitement. Des essais de congélation ont été prolongés jusqu'à 3 mois pour un échantillon donné. Aucune altération notable n'a été constatée.

En conclusion, il est possible de stocker les échantillons avant mesure et donc de ne pas travailler en extemporané.

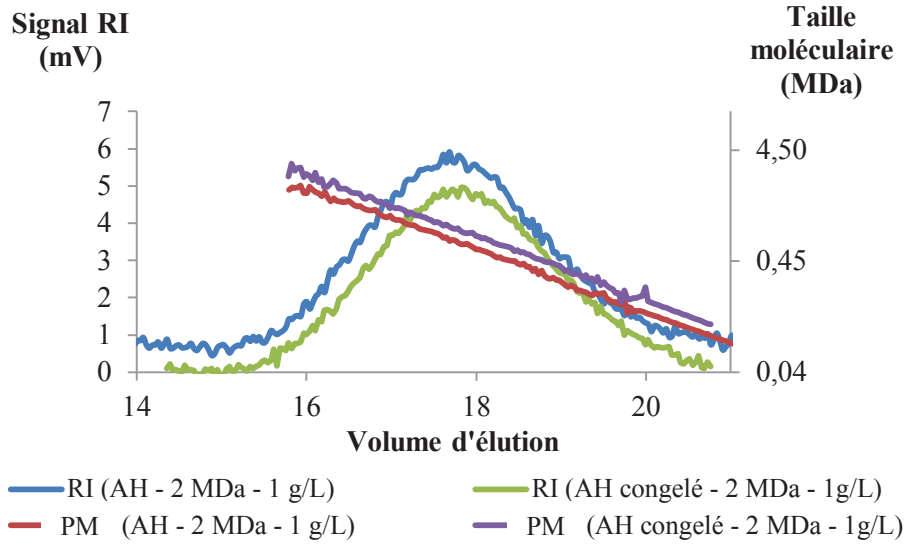


Figure 10. Chromatogrammes en exclusion de taille d'une solution d'AH à 1g/L ayant ou non été congelée à -20°C pendant une semaine. Les signaux réfractométrie (concentration en AH) ainsi que la réparation des tailles moléculaires dans l'échantillon sont représentées.

5. Conclusion

Diverses méthodes analytiques ont fait l'objet de développement, d'adaptations et de mises au point, d'ordre plus ou moins important, au cours de cette étude. D'autres méthodes ont simplement dû être mises en œuvre afin d'être validées. L'importance de cette étape est une nouvelle fois à souligner puisqu'elle se positionne à la racine de l'étude et du développement du procédé global de production d'AH par voie microbienne. En effet, divers manquements sur certains processus opératoires ont pu être constatés à l'entame de ces travaux. De plus, peu d'informations sûres étaient disponibles concernant le mécanisme de synthèse de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus,* ce qui a rendu obligatoire cette étape de développement des

méthodes analytiques. Un ensemble de moyens de suivi analytique de l'état physiologique de *Streptococcus zooepidemicus* ainsi que des différentes entrées et sorties intervenant dans son métabolisme a ainsi été défini (Figure 11).

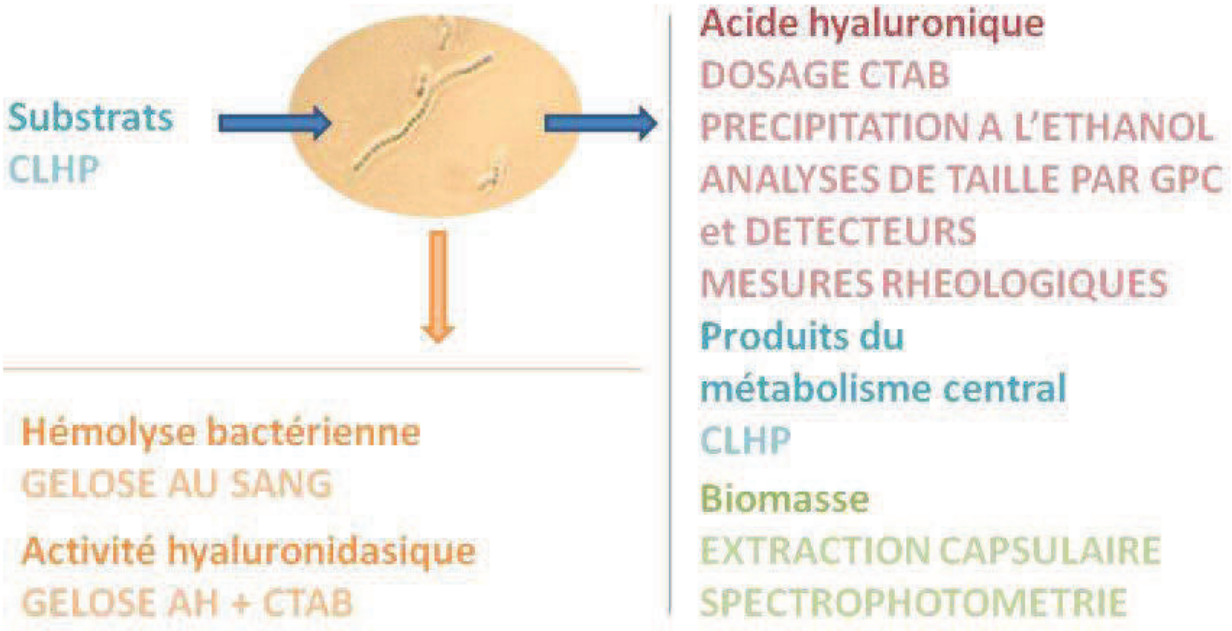


Figure 11. Résumé des méthodes analytiques importantes mises en œuvre pour un suivi complet de la physiologie et du métabolisme de Streptococcus zooepidemicus *au cours de cinétiques microbiennes.*

Chapitre II

Criblage et sélection de souches productrices d'AH

Document confidentiel

SOMMAIRE - RESULTATS CHAPITRE II

1. INTRODUCTION 95

2. CARACTERISATION INITIALE (DES PERFORMANCES) DES SOUCHES MICROBIENNES 95

3. CARACTERISATION AFFINEE, DES PERFORMANCES DES SOUCHES SELECTIONNEES, EN BIOREACTEUR DE 5 L 98

4. OBTENTION DE MUTANTS SURPRODUCTEURS D'AH NON HEMOLYTIQUES 102

4.1. DEFINITION DES CONDITIONS OPERATOIRES 103
4.2. PRODUCTION INITIALE DE MUTANTS A PARTIR DES SOUCHES ENVIRONNEMENTALES 104
4.3. PRODUCTION AMELIOREE DE MUTANTS A PARTIR DE SOUCHES ENVIRONNEMENTALES 106

5. CONCLUSION 107

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Exemples d'observations macroscopiques et microscopiques associées aux caractères majeurs du tableau 1.A : activité hémolytique révélée sur milieu BHI solide enrichi au sang de mouton (souche 11248). B : photographie prise au microscope optique (x40) d'une souche type se présentant sous forme de longues chaînes de coques (souche 10062). C : photographie prise au microscope optique (x40) d'une souche type sous forme de flocs (souche 6439). 96

Figure 2. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus. 99

Figure 3. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus. 99

Figure 4. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche 11248 de Streptococcus zooepidemicus. 100

Figure 5. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus. 100

Figure 6. Evolution du taux de survie chez la souche 10062 en fonction du temps d'exposition à la NTG (0,1 g/L). Les clones survivants sont dénombrés sur boîte de Pétri. 103

Figure 7. Synthèse des résultats obtenus au cours de l'étape de mutagénèse aléatoire à partir des souches 10062, 11248 et TDF1 de Streptococcus zooepidemicus. 104

Figure 8. Synthèse des résultats obtenus après application du protocole de mutagénèse aléatoire modifié (0,5 g/L de NTG) chez les souches TDF1 et 11248 de Streptococcus zooepidemicus. 105

Figure 9. Morphologie des colonies mutantes potentiellement surproductrices d'AH en comparaison au phénotype des souches environnementales et de la souche de référence ATCC 39920 (A). 107

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des données morphologiques et physiologiques de base concernant les souches sélectionnées pour cette étude. 96

Tableau 2. Production de biomasse et d'AH chez les souches 11053, 10062, 11248, TDF1 et ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus au cours de cultures en fioles d'Erlenmeyer. . 97

Tableau 3. Synthèse des données mesurées et calculées au cours de cultures mises en œuvre en bioréacteurs de 5 L pour les souches TDF1, 11248,10062 et ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus (milieu BHI). 101

Tableau 4. Synthèse des résultats obtenus sur une première série d'essais d'application du protocole de mutagénèse aléatoire développé (souches 10062, 11248 et TDF1). 104

CHAPITRE II : CRIBLAGE ET SELECTION DE SOUCHES PRODUCTRICES D'AH

1. Introduction

Les souches de *Streptococcus zooepidemicus* retrouvées dans leur environnement naturel sont, de par leur capacité à infecter un hôte, toutes des souches potentiellement productrices d'AH. Mais dans quelle mesure leur niveau de production est-il compatible avec une production industrielle ? Quelles caractéristiques sont représentatives d'une souche hyper-productrice ? Les caractéristiques de l'AH produit sont-elles souche-dépendantes ? Face à ces questions et face au manque d'informations disponibles sur ces micro-organismes au début de ces travaux, une démarche exploratoire et pragmatique a dû être adoptée afin de sélectionner une souche d'intérêt pour une production d'AH à l'échelle industrielle. Cette démarche tend à souligner les capacités d'une des souches disponibles sans pour autant écarter définitivement les autres souches. La première phase de cette étude consiste à recenser les caractéristiques phénotypiques, microscopiques et physiologiques des souches disponibles dans le but de sélectionner, sur la base de critères technologiques simples, un ou plusieurs candidats à la mutagénèse aléatoire. La deuxième étape de cette étude se concentrera sur l'étape clé de mutagénèse aléatoire afin d'obtenir, à partir de ces souches retenues, des clones non pathogènes (perte de l'activité hémolytique), hyper-producteurs d'AH et éventuellement non producteurs de hyaluronidases, s'il s'avère que cette activité enzymatique nuit effectivement aux performances du procédé de production.

2. Caractérisation initiale (des performances) des souches microbiennes

Toutes les souches de *Streptococcus zooepidemicus* disponibles au début de cette étude ont été stockées sous glycérol (30 %). Leurs caractéristiques microscopiques et macroscopiques ont été listées tout comme celles de la souche ATCC 6580 de référence disponible au laboratoire (Tableau 1 et Figure 1).

Tableau 1. Récapitulatif des données morphologiques et physiologiques de base concernant les souches sélectionnées pour cette étude.

Souche	Origine	Données macroscopiques		Données microscopiques	Activité hémolytique
		En milieu liquide	Sur milieu solide		
2398	Equidé	Formation de flocs	Colonies crème	Diplocoques ou amas de coques	+
5389	Equidé	Formation de flocs		Diplocoques ou amas de coques	
6439	Equidé	Formation de flocs		Diplocoques ou amas de coques	
10062	Equidé	Culture homogène		Longues chaînes de coques	
11053	Equidé	Culture homogène		Longues chaînes de coques	
11248	Equidé	Culture homogène		Longues chaînes de coques	
TDF1	AH « stérile »	Culture homogène		Longues chaînes et amas de coques	
6580	ATCC	Culture homogène		Longues chaînes et amas de coques	



Figure 1. Exemples d'observations macroscopiques et microscopiques associées aux caractères majeurs du tableau 1.A : activité hémolytique révélée sur milieu BHI solide enrichi au sang de mouton (souche 11248). B : photographie prise au microscope optique (x40) d'une souche type se présentant sous forme de longues chaînes de coques (souche 10062). C : photographie prise au microscope optique (x40) d'une souche type sous forme de flocs (souche 6439).

Ces premières informations référencées nous permettent, par comparaison à la souche ATCC 6580 de référence, de cibler certains critères d'importance pouvant se révéler caractéristiques de souches productrices d'AH (colonies crème, longues chaînes de coques …). Sur la base de ces observations le choix a été fait d'écarter, en première intention, les trois souches 2398, 5389 et 6439 se présentant sous forme de « flocs ». Cette décision est appuyée par le fait que ces trois souches posent de réels problèmes technologiques au niveau de la centrifugation

(difficultés à culotter), du comptage manuel des cellules et donc globalement pour la mise en place d'un système de dénombrement par spectrophotométrie (cellules en amas compacts). Dans le cadre d'études cinétiques fines et répétées, ce détail pourrait vite devenir un frein à l'évolution de cette étude sur le temps imparti. De plus, la conformation des cellules en substrat liquide peut nous conduire à soulever d'éventuels problèmes de remise en solution de l'AH dans le milieu de culture.

Des données physiologiques supplémentaires de base ont ensuite été recueillies sur les souches retenues. Les cultures associées ont été réalisées en fioles d'Erlenmeyer agitées sans ou avec baffles (pour améliorer le transfert de matière en général et d'oxygène en particulier), sur la base d'un milieu complexe (BHI) supplémenté en glucose (5 g/L). Les résultats correspondant à ces cultures en termes de croissance et de production d'AH sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2. Production de biomasse et d'AH chez les souches 11053, 10062, 11248, TDF1 et ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus *au cours de cultures en fioles d'Erlenmeyer.*

	Type de fiole	[biomasse] (g/L)	[AH]
11053	Classique	0,15	< 0,05 g/L
	Bafflée	0,17	
10062	Classique	0,25	
	Bafflée	0,3	
11248	Classique	0,42	
	Bafflée	0,32	
TDF1	Classique	0,64	
	Bafflée	0,7	
ATCC 6580	Classique	0,36	
	Bafflée	0,42	

L'analyse des résultats (Tableau 2) montre que des cultures en « simples » fioles d'Erlenmeyer ne permettent pas de mettre en place des conditions favorables à la production d'AH, et donc à la caractérisation technologique des souches considérées. En effet, aucune production d'AH n'est observée, que ce soit en fioles d'Erlenmeyer bafflées ou non ainsi qu'à partir de la souche ATCC de référence dont on sait qu'elle est productrice. La production de biomasse s'est donc imposée comme un moyen de criblage préliminaire. Celle-ci est améliorée dans des conditions de pseudo aération (fioles d'Erlenmeyer bafflées). La souche 11053 semble celle qui présente les moins bonnes capacités de production de

biomasse. De plus, aucune augmentation du diamètre des cellules (observations microscopiques) n'est constatée. Ce déficit lié à la croissance (en taille et en nombre de cellules) nous conduit à penser que cette souche 11053 est moins disposée à l'assimilation des sources nutritives et énergétiques disponibles pour la synthèse de ces matériaux constitutifs élémentaires. La souche 11053 est écartée (de manière non définitive) pour l'étape de mutagénèse aléatoire.

Aucune production d'AH n'est observée sur un système de mise en œuvre en fioles d'Erlenmeyer à partir des souches à disposition (souches dites « environnementales » et souche ATCC). La production de biomasse est améliorée dans des conditions de pseudo-aération. Ces essais montrent qu'il est nécessaire de passer à une caractérisation plus fine d'un point de vue physiologique mais plus lourde expérimentalement (en bioréacteur) impliquant des conditions contrôlées en mode cinétique et non en « point final ».

3. Caractérisation affinée, des performances des souches sélectionnées, en bioréacteur de 5 L

La nécessité de passer en conditions mieux contrôlées, avec des volumes plus importants pour pourvoir réaliser des études cinétiques, s'est imposée suite au premier essai de caractérisation des souches. Des cultures à plus grande échelle (bioréacteur de 5 L) ont alors été mises en œuvre afin d'étudier, chez les souches retenues, des prédispositions à la synthèse d'AH.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
30 h	5 L	BHI	37 °C	Non contrôlé	0,5 à 1 vvm	300 à 600 tr/mn

Souches mises en œuvre : ATCC 6580, 10062, 11248, TDF1.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique.

Aucune régulation du pH n'est effectuée. En effet, même si les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins, il était important pour ces premiers essais d'observer et d'analyser l'évolution du pH

sur une cinétique de croissance afin de cumuler des informations quant au métabolisme de *Streptococcus zooepidemicus*. L'effet stimulant de la pO_2 sur la croissance chez ces bactéries aérobies facultatives, a été démontré au cours du crible précédent (paragraphe 2 du présent chapitre). Dans le but de ne pas limiter la cellule en oxygène, la pO_2 est maintenue à un seuil limite bas de 50 % par une régulation en cascade de la vitesse d'agitation (300 à 600 tr/mn) et du débit d'aération (0,5 à 1 vvm).

Résultats

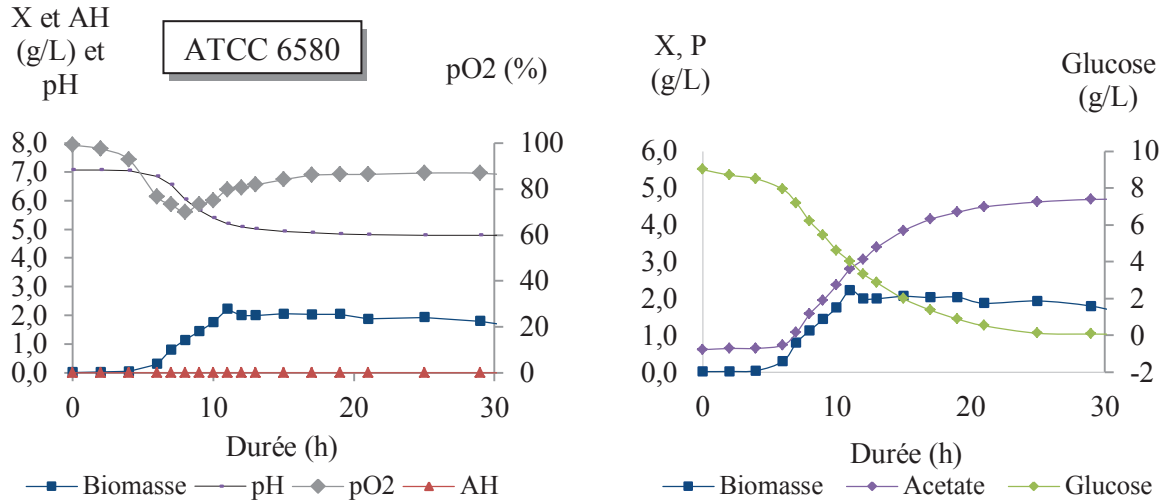


Figure 2. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus.

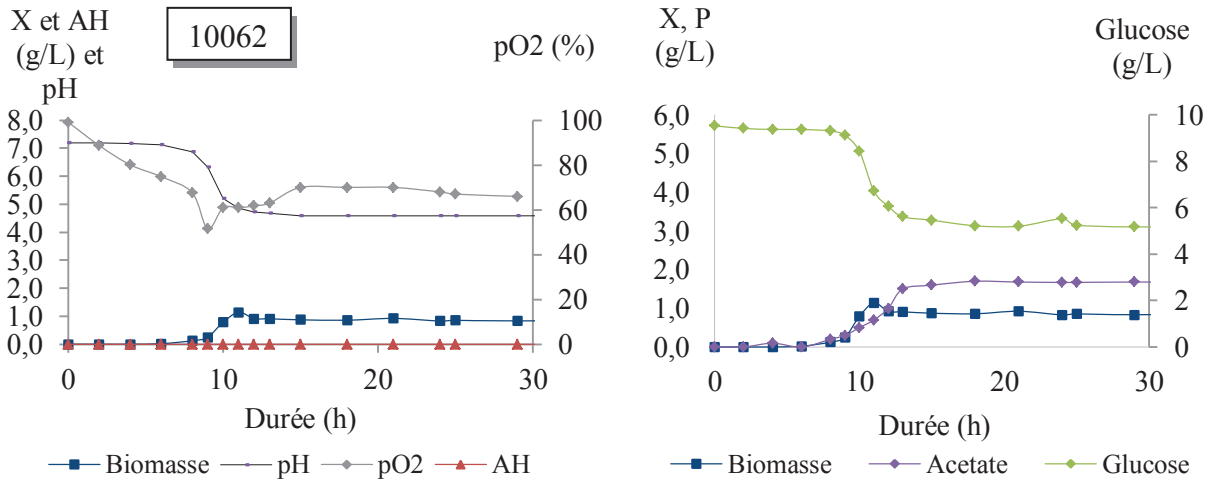


Figure 3. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus.

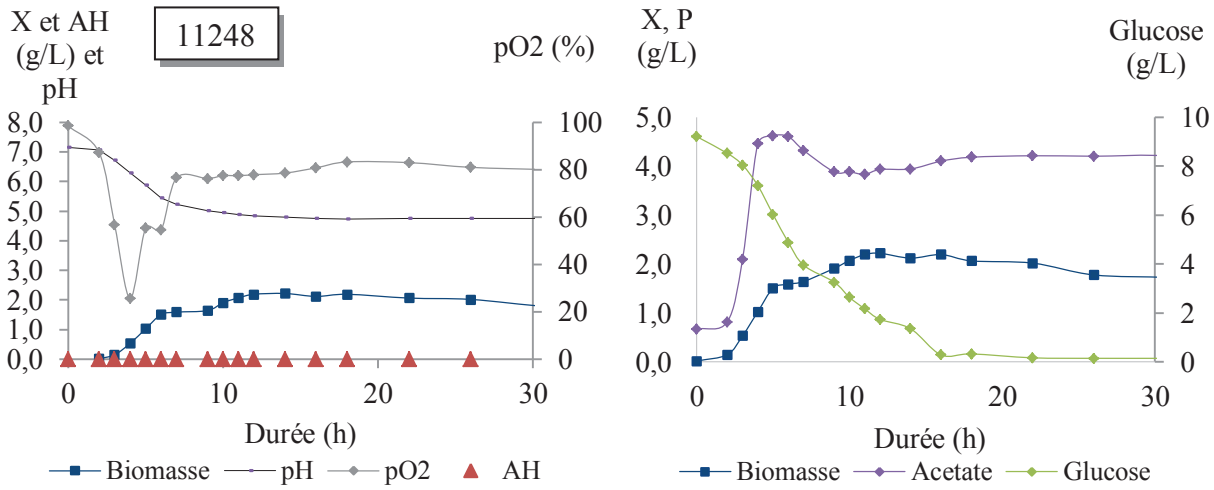


Figure 4. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche 11248 de Streptococcus zooepidemicus.

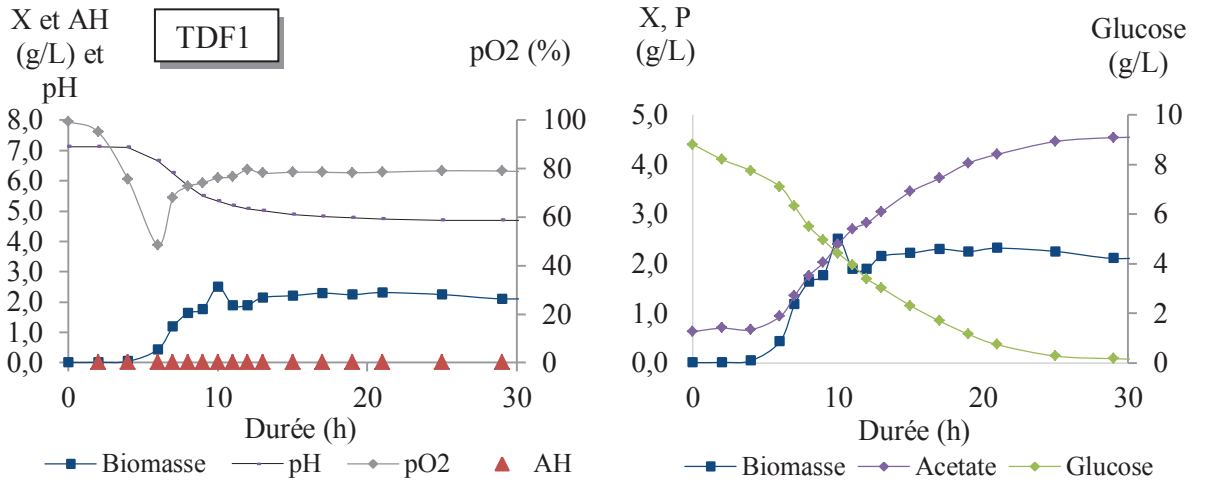


Figure 5. Cinétiques obtenues à partir d'une culture en bioréacteur de 5 L (milieu BHI) de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.

Les résultats (Figure 2Figure 3Figure 4Figure 5) mettent en évidence un métabolisme primaire basé sur l'oxydation catabolique du glucose. La composition du milieu comprenant un large excès en sources azotées organiques complexes, le glucose joue très certainement un rôle, pour l'essentiel, de substrat énergétique. Pour la souche de référence ATCC 6580 et les souches environnementales 11248 et TDF1, le glucose est consommé intégralement (Figure 2, Figure 4Figure 5).

Tableau 3. Synthèse des données mesurées et calculées au cours de cultures mises en œuvre en bioréacteurs de 5 L pour les souches TDF1, 11248,10062 et ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus *(milieu BHI).*

	TDF1	11248	10062	ATCC6580
$X_{max\ (g/L)}$	2,3	2,2	0,7	2,2
$Y_{(g\ X/g\ glc)}$	0,52	0,43	0,25	0,44
$\mu_{max\ (h^{-1})}$	0,63	0,72	0,68	0,63

Des vitesses spécifiques de production de biomasse comparables sont observées avec des concentrations cellulaires maximales atteintes de l'ordre de 2 g/L et des rendements de conversion du glucose de l'ordre de 0,5 g de biomasse par g de glucose (Tableau 3). Tous les essais présentent une phase de consommation d'oxygène au cours de la croissance et une acidification subséquente du milieu est observée du fait de la production d'acide acétique. Il s'ensuit une phase de consommation de glucose sans croissance avec une remontée de la pO_2 et une poursuite de la production d'acide acétique. Le métabolisme hétérolactique voire homolactique décrit dans la littérature chez *Streptococcus zooepidemicus* n'est pas retrouvé ici, même chez la souche de référence.

Le substrat glucose n'est, par contre, pas consommé intégralement par la souche 10062 et ce, probablement en raison d'une phase de latence résultant d'un état physiologique inapproprié au démarrage de la culture (Figure 3). Même si les vitesses spécifiques de croissance restent comparables, il y a deux fois moins de production de biomasse pour des rendements de conversion du glucose diminués d'un facteur 2 en comparaison aux autres souches.

Un phénomène de compétition entre production d'AH et production de biomasse est soulevé dans la littérature (Blank et al., 2005). Néanmoins, une consommation de glucose sans croissance ne permet pas d'observer de production d'AH à une concentration supérieure à 0,05 g/L (seuil de détection des méthodes de dosage utilisées) et ce même chez la souche ATCC 6580 de référence. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Tout d'abord, l'influence du pH peut être clairement mise en avant. La littérature dénote qu'à des pH en dessous de 6, la production d'AH mais aussi la taille moléculaire de l'AH produit sont affectés. Dans le cas de ces cinétiques microbiennes, le pH diminue en dessous de 5. Ensuite, il est possible que le milieu de culture utilisé présente une carence particulière en un élément nutritif essentiel à la synthèse d'AH ou qu'au contraire, le milieu présente, dans sa

composition, un élément inhibiteur. En outre, les cultures concernées ont au minimum été maintenues en conditions d'oxygénation non limitantes. Une limitation serait peut être nécessaire pour reproduire l'environnement physiologique responsable de la synthèse d'AH (Liu et al., 2008a).

Il n'y a donc pas de production notable d'AH avec des souches dont l'une devrait être productrice (ATCC) dans les conditions de culture « classiques » appliquées. Il y a donc nécessité de travailler en parallèle selon deux axes : « l'optimisation » des conditions de culture (chapitres III et IV) et le développement de souches surproductrices par mutagénèse aléatoire (fin de ce chapitre II). Une synthèse des résultats sera développée dans le Chapitre V.

4. Obtention de mutants surproducteurs d'AH et non hémolytiques

La mutagénèse aléatoire est utilisée depuis des décennies dans le domaine de l'industrie. Cette technique est, en effet, facile de mise en œuvre et ne nécessite pas de connaissances élaborées sur la souche modifiée. Elle permet ainsi de générer facilement un large éventail de mutants. De plus, la pratique d'une mutagénèse dite dirigée s'est présentée comme impossible puisque le séquençage des souches environnementales récupérées n'a pas été réalisé.

La N-méthyl, N'-nitro, N-nitrosoguanidine (NTG) est un agent alkylant de l'ADN qui va fixer préférentiellement un groupement méthyl sur la guanine, entraînant une altération chimique de l'ADN pouvant être réparée ou non. Si le système de réparation des mésappariements ou « mismatch repair » (MMR) ne détecte pas le défaut d'association lors de la réplication, des modifications des séquences auront lieu, entraînant éventuellement une expression phénotypique modifiée portant sur un des critères recherchés : production d'AH et/ou hémolyse. Ceci traduit de la nécessité de trouver le bon barème pour avoir une bonne mutagenèse sans tuer l'intégralité des cellules outre mesure, et impose d'optimiser les conditions de mutagénèse.

4.1. Définition des conditions opératoires

Dans un premier temps, il était important d'établir, par le biais d'essais, la concentration en NTG et le temps d'exposition nécessaires pour obtenir chez, *Streptococcus zooepidemicus,* à la fois un taux de mutation élevé et une quantité acceptable de mutants résiduels. Arbitrairement, un taux de mortalité supérieur à 99 %, dénotant d'une déstabilisation élevée du système de réplication, est recherché. Sur une base initiale de 0,1 g/L de NTG comme concentration appliquée, différentes durées d'exposition à l'agent alkylant ont été explorées. La souche 10062 a été choisie pour la définition des conditions opératoires chez cette espèce afin de les extrapoler par la suite chez les autres souches. Les résultats sont présentés en Figure 6.

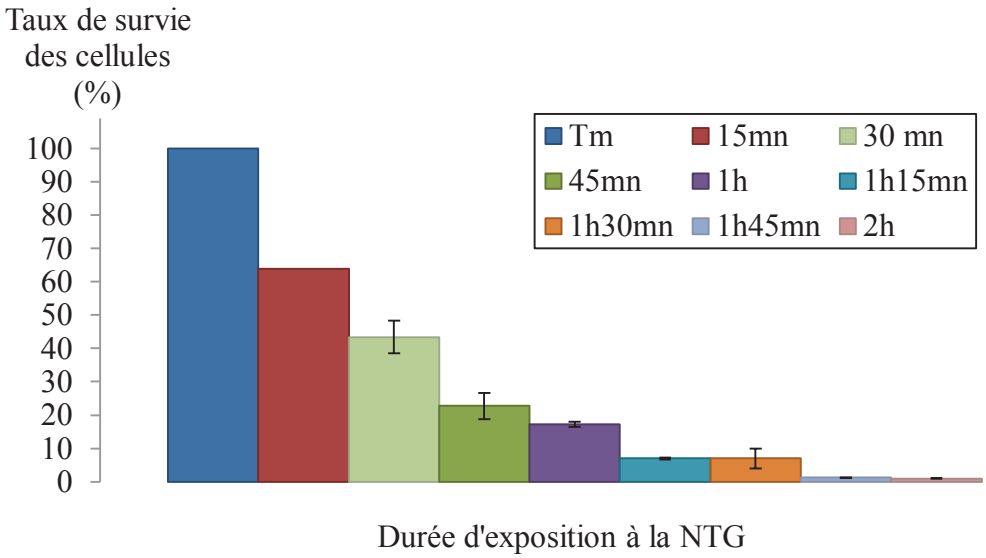


Figure 6. Evolution du taux de survie chez la souche 10062 en fonction du temps d'exposition à la NTG (0,1 g/L). Les clones survivants sont dénombrés sur boîte de Pétri.

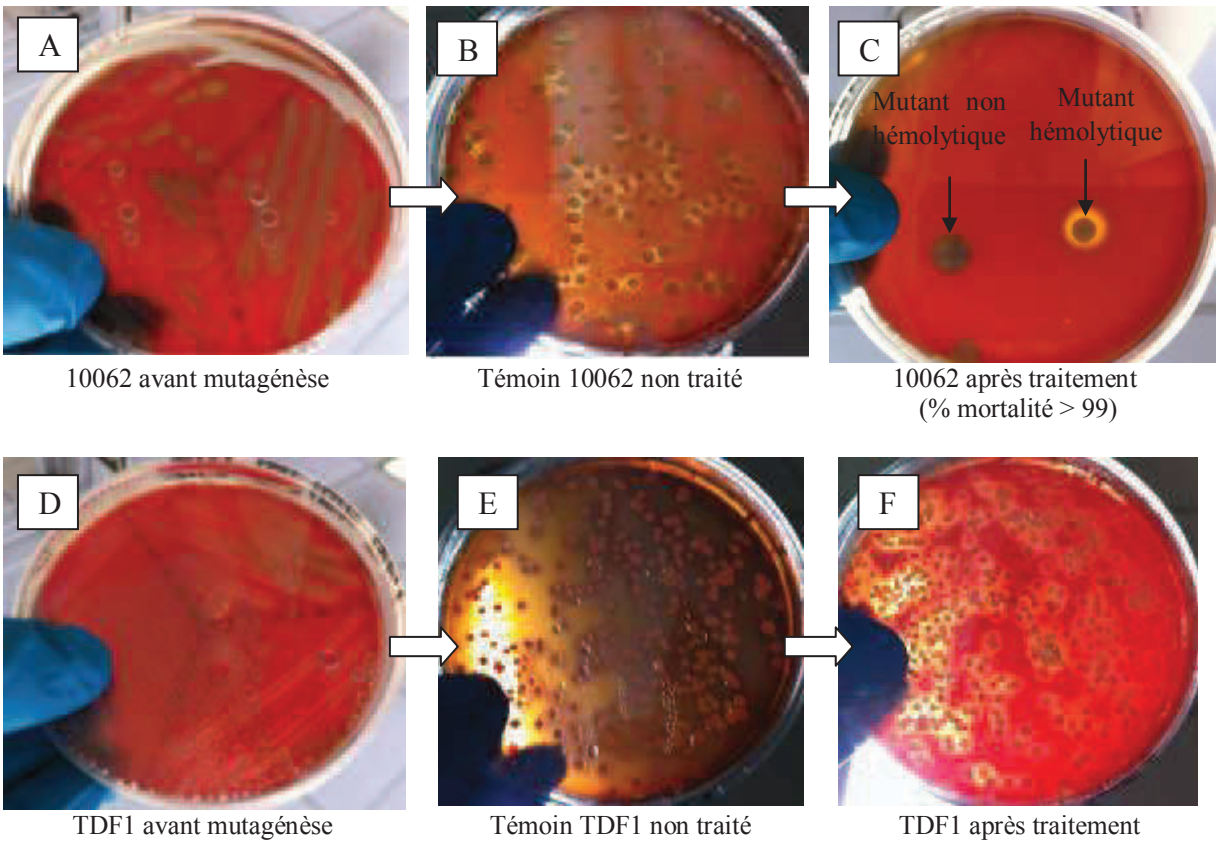
Avec une concentration de 0,1 g/L de NTG, la mortalité augmente classiquement avec le temps suivant une cinétique d'ordre 1 pour atteindre une valeur seuil supérieure à 99 % au-delà de deux heures. Ces conditions opératoires de mutagénèse aléatoire (2 h d'exposition, 1 g de NTG pour 10^{10} cellules) définies ici pour la souche 10062, ont ensuite été appliquées telles quelles à l'ensemble des souches environnementales.

4.2. Production initiale de mutants à partir des souches environnementales

Un protocole opératoire proposant une durée d'exposition de 2 h à la NTG (1 g / 10^{10} cellules) a été proposé suite aux essais précédents développés à partir de la souche 10062. Ce protocole est ensuite appliqué à chacune des souches « environnementales » retenues Les premiers résultats sont présentés dans la Figure 7 et synthétisés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Synthèse des résultats obtenus sur une première série d'essais d'application du protocole de mutagénèse aléatoire développé (souches 10062, 11248 et TDF1).

Souche	[NTG]	% de survie	Mutants non hémolytiques obtenus	Révertants	Mutant stable
10062	1 g/10^{10} cell	0,1 à 1	9	8	1
TDF1	1 g/10^{10} cell	100	0	x	x
11248	1 g/10^{10} cell	100	0	x	x



10062 avant mutagénèse | Témoin 10062 non traité | 10062 après traitement (% mortalité > 99)

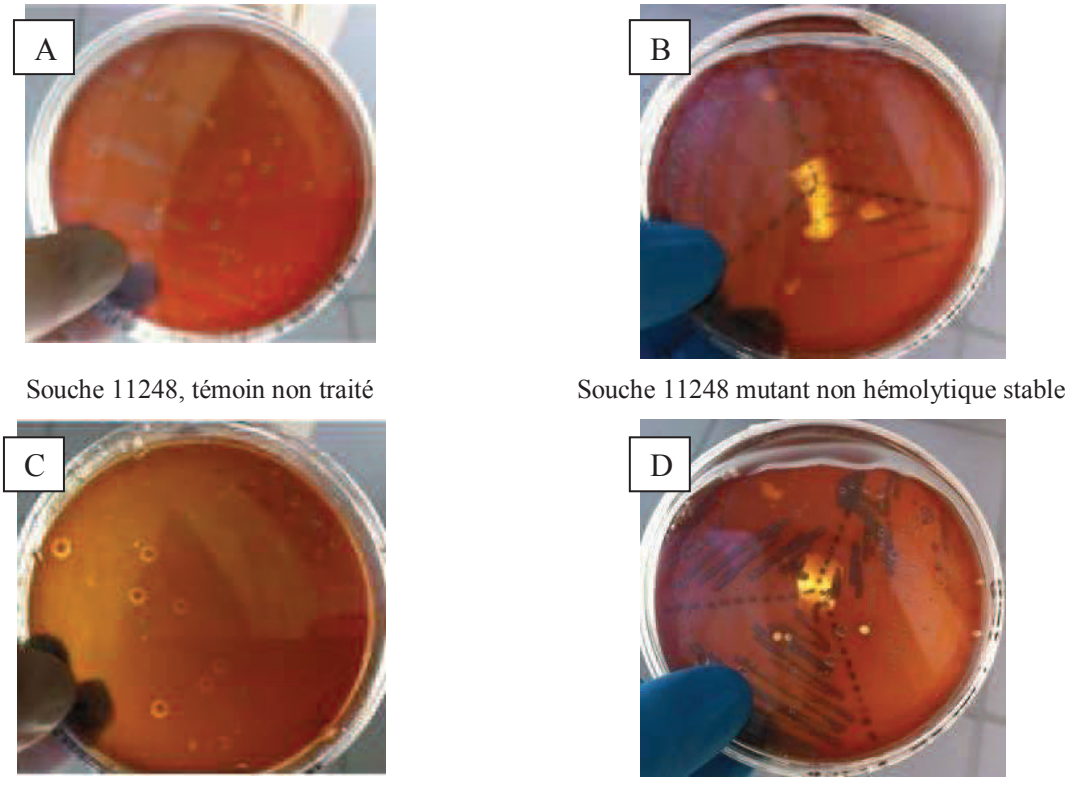
TDF1 avant mutagénèse | Témoin TDF1 non traité | TDF1 après traitement

Figure 7. Synthèse des résultats obtenus au cours de l'étape de mutagénèse aléatoire à partir des souches 10062, 11248 et TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.

Le caractère hémolytique des souches retenues a été confirmé avant pratique du protocole de mutagénèse aléatoire. La Figure 7 A, B et C met en avant l'obtention de résultats intéressants

pour la souche 10062. Sur divers essais de mutagénèse, 9 mutants non hémolytiques ont pu être obtenus sur plusieurs séries d'essais. Sur ces 9 mutants obtenus, seul 1 est apparu comme stable sur plusieurs générations (Tableau 4). L'apparition de révertants au cours des différents repiquages sur milieu liquide et milieu solide est néanmoins logique puisque stimulée par l'inoculation sur milieu enrichi au sang de mouton.

Parallèlement, la Figure 7 D, E et F révèle un problème de sensibilité à la NTG qui est souche-dépendante. En effet, à l'exemple de la souche TDF1, la relation dose/réponse n'est pas la même chez la souche 10062 et les souches TDF1 et 11248. Le protocole a donc été ajusté en multipliant par un facteur 5 la concentration appliquée en NTG. Les résultats sont présentés en Figure 8. Une concentration appliquée de 5 g de NTG pour 10^{10} cellules nous permet d'obtenir des mutants non hémolytiques stables chez les souches TDF1 et 11248.



Souche 11248, témoin non traité

Souche 11248 mutant non hémolytique stable

Souche TDF1, témoin non traité

Souche TDF1, mutant non hémolytique stable

Figure 8. Synthèse des résultats obtenus après application du protocole de mutagénèse aléatoire modifié (0,5 g/L de NTG) chez les souches TDF1 et 11248 de Streptococcus zooepidemicus.

Tout au long de ces essais de mutagénèse aléatoire, plusieurs mutants non hémolytiques, stables ou non, sur plusieurs générations ont ainsi pu être obtenus. Néanmoins, aucune colonie au phénotype atypique (halo éventuel recherché autour des colonies) n'a pu être obtenue. Ces premiers essais de mutagénèse aléatoire nous ont permis de nous approcher de conditions efficaces d'obtention de mutants non hémolytiques fortement producteurs d'AH. Afin de multiplier nos chances d'obtenir des mutants présentant les phénotypes recherchés, des expériences en masse doivent être réalisées sur la base d'un protocole redéfini.

4.3. Production améliorée de mutants à partir de souches environnementales

La multiplication des essais sur la base du protocole défini n'a permis d'obtenir, sur le long terme, que des mutants non-hémolytiques. Une phase de mutagénèse et de criblage à grande échelle a donc été mise en place. Pour cela un mélange de toutes les souches « environnementales » disponibles au laboratoire (10062, 11248, 11053, 2398, 5389, 6439, TDF1) a été réalisé à la suite d'étapes préliminaires de régénération sur milieu solide (BHI) et de cultures en milieu liquide (BHI + 20 g/L de glucose) réalisées séparément. Le dénombrement a été réalisé à l'aide d'une équation moyennée de quantification de la biomasse par spectrophotométrie ($DO = 2{,}6.10^{9}. [X] + 0{,}02$).

Dans les conditions expérimentales mises en jeu, 26 000 mutants ont été obtenus. Le crible s'est alors porté sur la recherche d'un phénotype atypique (recherche de colonies éventuellement entourées d'une matrice externe).

Sur ces 26 000 mutants, moins d'une dizaine présentaient un aspect de colonie entourée d'une matrice externe opaque non visqueuse (aspect « d'œuf au plat »), et seulement quatre étaient présents sous forme d'une colonie presque imperceptible entourée d'une large matrice externe visqueuse et translucide (aspect de « goutte d'eau »). Les morphologies associées sont présentées au niveau de la Figure 9. Les souches mutantes type « œuf au plat » (Figure 9 B), ne présentant pas de matrice « visqueuse », n'ont pas été exploitées par la suite car jugées moins performantes que leurs consœurs en « goutte d'eau ». Elles n'ont, par conséquent, pas été conservées. Les souches type « goutte d'eau » ainsi obtenues (Figure 9 C, D, E, F) et donc potentiellement intéressantes technologiquement feront l'objet de caractérisation de

performances plus fines (partie « Résultats » - Chapitre V) au cours de cinétiques dans des conditions de culture adaptées (application des résultats du Chapitre III et IV de la partie « Résultats »).

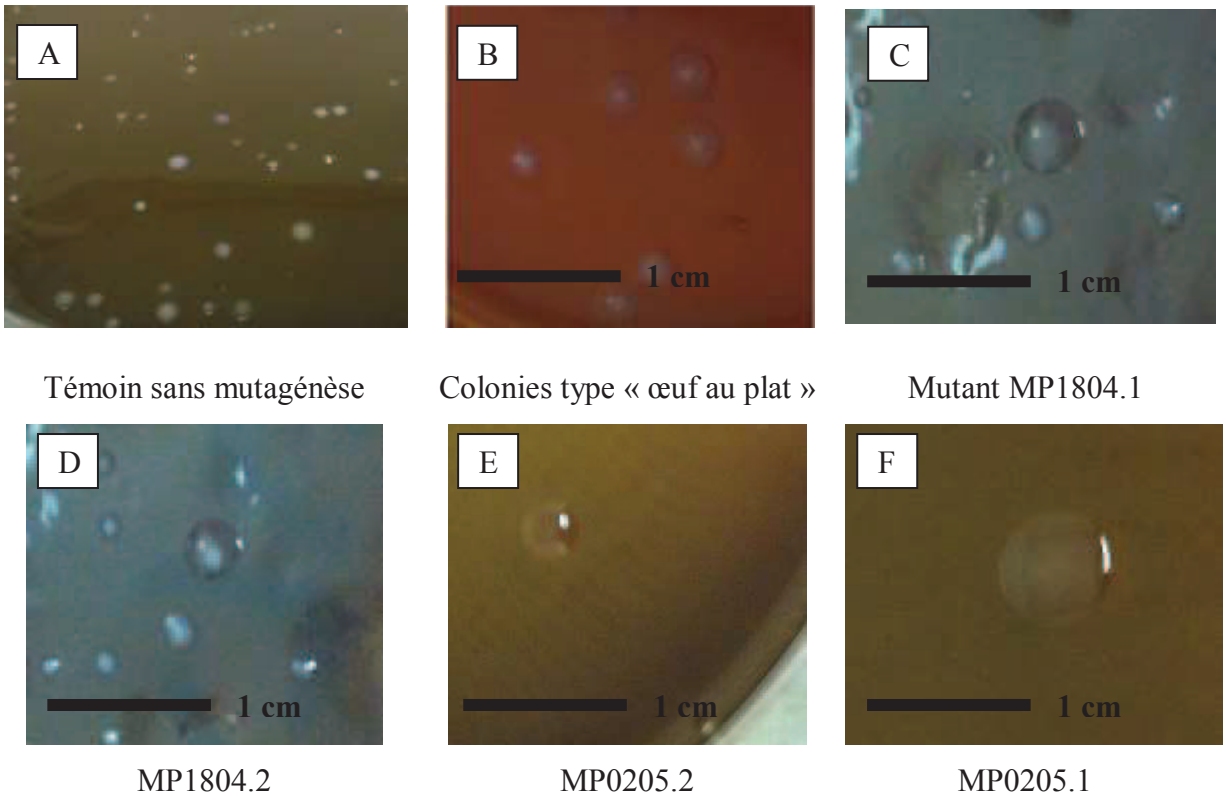


Figure 9. Morphologie des colonies mutantes potentiellement surproductrices d'AH en comparaison au phénotype des souches environnementales et de la souche de référence ATCC 39920 (A).

5. Conclusion

Une caractérisation initiale en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteurs de 5 L de toutes les souches à disposition a été mise en œuvre. Aucune production d'AH n'a pu être observée alors que la souche ATCC 6580 est utilisée en référence pour la production d'AH. Une problématique à double échelle est donc soulevée, des performances de production souche-dépendante et/ou des performances inhérentes aux conditions de culture.

Des souches potentiellement intéressantes et stables ont été obtenues par mutagénèse aléatoire. En effet, en comparaison des souches environnementales ainsi que de la souche de référence, un nouveau phénotype a pu être observé. Il se présente sous la forme de petites

colonies (couleur crème) entourées d'une large matrice externe translucide et visqueuse. Les mutants sélectionnés ont été stockés pour des essais de production d'AH en bioréacteur (partie « Résultats » - chapitre V).

L'étape de mutagénèse aléatoire a été mise en œuvre en parallèle des études « d'optimisation » du procédé de production d'AH dont les étapes de développement sont décrites dans le chapitre III et IV (Partie « Résultats »).

Chapitre III

Mise en œuvre d'un procédé de production d'AH par voie microbienne – formulation du milieu de culture

Document confidentiel

SOMMAIRE - RESULTATS CHAPITRE III

1. INTRODUCTION 113

2. FORMULATION DU MILIEU DE CULTURE : ETUDES PRELIMINAIRES A PARTIR DE SOUCHES D'INTERET. 114

2.1. EVALUATION PREALABLE DES CARACTERISTIQUES D'UN MILIEU ISSU DE LA LITTERATURE (KIM ET AL., 1996) 114
2.2. FORMULATION ET EVALUATION INITIALES D'UN MILIEU DE CULTURE EXPLOITABLE A PLUS GRANDE ECHELLE 116
2.3. ETUDE DE L'INFLUENCE DU RAPPORT C/N AU SEIN DU MILIEU PKN 120
2.4. CRIBLAGE DE SUBSTRATS D'INTERET : APPROCHE AU « UN FACTEUR A LA FOIS » 124
2.5. AMELIORATION DE LA COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE EN UTILISANT LES SUBSTRATS PRECEDEMMENT SELECTIONNES 130
2.6. VALIDATION DU MILIEU FORMULE 136

3. ETUDE COMPLEMENTAIRE BASEE SUR UNE REORIENTATION DES FLUX METABOLIQUES 141

4. CONCLUSION 148

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Cinétiques en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 50 %). Souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus. 119

Figure 2. Schéma simplifié des phénomènes de catabolisme et d'anabolisme intervenant chez Streptococcus zooepidemicus. 122

Figure 3. Comparaison des performances de production des souches 10062, TDF1 et 11248 de Streptococcus zooepidemicus sur la base du milieu de culture PKN nouvellement formulé. 123

Figure 4 Courbes exprimant la relation entre les rations C/S et N/S et la production d'AH128

Figure 5. Schéma synthétique des phénomènes d'équilibre du potentiel d'oxydo-réduction pouvant intervenir chez Streptococcus zooepidemicus au cours d'une mise en culture..... 129

Figure 6. Expression des valeurs observée en fonction des valeurs prédites par le modèle et R^2 associés. 133

Figure 7. Surfaces de réponses obtenues suite à la résolution du plan d'expériences pour déterminer l'influence des facteurs « concentration en glucose », « concentration en peptone de soja E110 » et « concentration en extraits de levure 444 » sur la production d'AH (A= C_{max} et C= $Y_{AH/X}$) et de biomasse (B). 134

Figure 8. Représentation graphique de la surface de réponses obtenue en étudiant l'influence de la concentration en glucose et de la concentration en extraits de levure 444 pour un niveau de concentration en peptone de soja E110 fixé à 13,8 g/L (paramètre optimisé). 135

Figure 9. Cinétiques en bioréacteur Applikon (3L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 50 %). Souche 11248 de Streptococcus zooepidemicus. *139*

Figure 10. Cinétiques en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 50 %). Souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus. *139*

Figure 11. Recherche de l'activité hyaluronidasique à partir de concentrats protéiques issus des cultures en bioréacteur des souches TDF1 et 11248 de Streptococcus zooepidemicus. *140*

Figure 12.Expression des valeurs observées en fonction des valeurs prédites par le modèle, et R^2 associés. *144*

Figure 13.Surfaces de réponses obtenues (En haut : production de biomasse. En bas : production d'AH) suite à la résolution du plan d'expériences à trois facteurs et trois niveaux. *145*

Figure 14.Surfaces des réponses obtenues (En haut : production d'acétate. En bas : production de lactate) suite à la résolution du plan d'expériences à trois facteurs et trois niveaux...... *146*

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principales informations issues des cultures des souches 11248, 10062, TDF1 et ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus en bioréacteurs SixFors (500 mL) dans un milieu de culture issu de la littérature (Kim et al., 1996). *115*

Tableau 2. Composition initiale du milieu de culture PKN formulé au cours de cette étude. *117*

Tableau 3. Recouvrements carbonés et vitesses spécifiques maximales de croissance calculés pour des essais en bioréacteurs Applikon (3L) à partir de la souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus. Comparaison de deux milieux en conditions de pH régulé et non régulé... *119*

Tableau 4. Synthèse des informations apportées suite aux cultures mises en œuvre à partir de la souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus en fioles d'Erlenmeyer dans le cadre de l'étude de l'influence du ratio glucose/peptone sur la synthèse d'AH...... *121*

Tableau 5. Résumé des résultats obtenus par substitution du glucose dans le cadre de l'étude au « un facteur à la fois » à partir de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.... *125*

Tableau 6. Résumé des résultats obtenus par substitution du glucose dans le cadre de l'étude au « un facteur à la fois » à partir de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.... *125*

Tableau 7. Résumé des résultats obtenus par ajout de complément au milieu PKN dans le cadre de l'étude au « un facteur à la fois » pour la formulation d'un milieu de culture à partir de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus. *126*

*Tableau 8. Synthèse des données relatives aux essais au « un facteur à la fois » ayant permis d'observer une amélioration significative de la production d'AH. *Les rapports C/S et N/S ont été calculés à partir de la composition en acides aminés des lots de peptones et d'extrait de levure utilisés ainsi qu'à partir de la composition globale des différents milieux de culture.* *127*

Tableau 9. Structure du plan d'expériences pour l'optimisation de la composition du milieu de culture en fioles d'Erlenmeyer pour la production d'AH chez Streptococcus zooepidemicus. *131*

Tableau 10. Bilan des réponses obtenues pour la production d'AH et la production de biomasse suite à la réalisation d'un plan d'expériences à trois facteurs et trois niveaux. .. *132*

Tableau 11. Evaluation des performances des souches environnementales et de référence cultivées dans le milieu PKN optimisé. *137*

Tableau 12. Structure du plan d'expériences pour l'optimisation de la composition du milieu de culture en fioles d'Erlenmeyer pour la production d'AH chez Streptococcus zooepidemicus. *143*

Tableau 13. Composition du milieu de culture PKN suite aux résultats du plan d'expériences. *147*

CHAPITRE III : MISE EN OEUVRE D'UN PROCEDE DE PRODUCTION D'ACIDE HYALURONIQUE MICROBIEN – FORMULATION DU MILIEU DE CULTURE

1. Introduction

La production d'AH à l'échelle de bioréacteurs de laboratoire, à l'échelle pilote ou à l'échelle industrielle, implique une maîtrise et donc une compréhension du procédé sous tous ses aspects. Ainsi, deux facteurs clés ressortent : les caractéristiques de la souche d'intérêt industriel et ses conditions de mise en œuvre. Le chapitre II, de cette partie « Résultats », a présenté ce premier aspect de sélection de souches par mutagenèse aléatoire. Dans une démarche idéale, ce troisième chapitre ainsi que le Chapitre IV qui suit, consacrés à la compréhension des phénomènes majeurs impliqués dans le mécanisme de production d'AH, devraient faire appel dès le départ aux souches obtenues à l'issue des travaux du chapitre II. Cependant, ce travail s'étant déroulé sous forte contrainte de temps, les études initiales concernant la recherche d'une mise en œuvre efficace des organismes producteurs ont été réalisées de façon simultanée au développement de souches surproductrices. De ce fait, les étapes de ce chapitre, focalisées sur la formulation d'un milieu de culture, ont été réalisées en utilisant principalement les souches environnementales non modifiées et donc faiblement productrices d'AH ainsi que la souche de référence ATCC 6580. Sur cette base d'étude, nous chercherons à évaluer l'impact de la composition initiale du milieu de culture sur la production d'AH. Un milieu sera ainsi formulé dans l'optique d'une exploitation à plus grande échelle.

A l'issue de cette phase préparatoire (formulation), les productions d'AH demeurant trop faibles pour pouvoir interpréter correctement les résultats des campagnes d'expérimentation, les études relatives à l'amélioration des conditions physico-chimiques de mise en œuvre de *Streptococcus zooepidemicus* (Chapitre IV) seront effectuées en utilisant une autre souche ATCC de référence présentant des capacités initiales de production d'AH plus exploitables scientifiquement que les souches à disposition.

2. Formulation du milieu de culture : études préliminaires à partir de souches d'intérêt.

L'objectif de ce paragraphe consiste en la formulation d'un milieu de culture répondant aux exigences de *Streptococcus zooepidemicus* (croissance et production d'AH). Ce milieu de culture devra, en complément, répondre à des exigences technologiques en vue d'une industrialisation potentielle du procédé. La démarche adoptée vise à développer ce milieu de culture sur la base d'informations issues de la littérature mais aussi sur la base d'une étude liée aux exigences métaboliques de *Streptococcus zooepidemicus*. Nous procéderons, dans un premier temps, à des essais avec un milieu référencé dans la littérature dans le but d'orienter la suite des recherches. Par la suite, la formulation d'un milieu de culture répondant aux contraintes de développement sera abordée.

La multiplication des essais impliquée par ce type d'étude, fera qu'une large majorité de cultures sera mise en œuvre à l'échelle de la paillasse (cultures en fioles d'Erlenmeyer).

2.1. Evaluation préalable des caractéristiques d'un milieu issu de la littérature (Kim et al., 1996)

Cette étude visant à formuler un milieu de culture approprié pour la production d'AH de haut poids moléculaire a débuté par l'évaluation des performances d'un milieu issu de la littérature. En effet, les résultats de criblage présentés dans le Chapitre II de la partie « Résultats » montrent que la synthèse d'AH est négligeable dans des conditions nutritives et physico-chimiques peu maîtrisées. L'influence possible du milieu de culture a été soulevée. Des cultures microbiennes ont été mises en œuvre dans quatre bioréacteurs (SixFors) d'une capacité unitaire de 500 mL afin d'expérimenter l'influence d'un milieu de culture dont la composition est issue de la littérature (concentration initiale en glucose à 25 g/L). En raison du faible volume utile (300 mL), les prélèvements ont été limités (pas de cinétique complète). Les trois souches « environnementales » sélectionnées, (partie « Résultats » - chapitre II) ainsi que la souche de référence ATCC 6580, ont été utilisées à titre de modèle d'étude.

Conditions opératoires						
Durée	**Volume**	**Milieu de culture**	**T**	**pH**	**Aération**	**Agitation**
30 h	500 mL	Kim et al., (1996)	37 °C	Non contrôlé	0,5 à 1 vvm	300 à 600 tr/mn

Souches mises en œuvre : ATCC 6580, 10062, 11248, TDF1.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse et d'AH.

Dans le but de ne pas faire varier deux paramètres à la fois et afin de statuer sur l'influence réelle de la composition milieu de culture sur la production d'AH, le pH n'a pas été régulé. Il a toutefois été mesuré. La pression partielle en oxygène mesurée a été maintenue à un seuil limite bas de 50 % par une régulation en cascade de la vitesse d'agitation (300 à 600 tr/mn) et du débit d'aération (0,5 à 1 vvm). Les résultats sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Principales informations issues des cultures des souches 11248, 10062, TDF1 et ATCC 6580 de Streptococcus zooepidemicus *en bioréacteurs SixFors (500 mL) dans un milieu de culture issu de la littérature (Kim et al., 1996).*

Souche	Evolution du pH	Glucose consommé (g/L)	Xmax (g/L)	[AH] (g/L)
11248	6,5 à 5,1	2	0,10	< 0,05
10062	6,7 à 5	5	1,20	< 0,05
TDF1	6,5 à 5,3	1,8	0,25	< 0,05
ATCC 6580	6,7 à 5,3	3,3	0,35	< 0,05

La principale information relative à ces essais tient de la préparation du milieu de culture. En effet, ce milieu présente de gros problèmes d'apparition de précipités et ce quelles que soient les méthodes de préparation et de stérilisation de chacun des éléments le composant. Les données fournies dans la littérature sont très probablement incomplètes, pour ne pas dire volontairement tronquées.

Concernant les cinétiques observées, nous pouvons constater une diminution « attendue » du pH au cours de la culture en raison de la formation d'acides organiques, liée au métabolisme central de ces bactéries lactiques. Aucune production d'AH n'est mesurable dans le milieu de culture, et ce, même à partir d'une souche ATCC présentée comme productrice d'AH. La production de biomasse n'est, de plus, pas favorisée sur la base de ce milieu de culture à

l'exception des essais réalisés à partir de la souche 10062 qui présente une $[X]_{max}$ équivalente aux essais précédents. Un effet inhibiteur, de la concentration initiale en glucose (25 g/L) sur l'activité enzymatique pourrait en être la cause (Pires et al., 2010).

La composition du milieu de culture a donc un effet notoire sur la croissance chez *Streptococcus zooepidemicus*. La concentration initiale en glucose et éventuellement l'équilibre entre les sources carbonées/énergétiques et les sources azotées jouent peut-être un rôle clé dans le processus de synthèse de l'AH (Chen et al., 2009). Des paramètres physico-chimiques tels que le pH et la pO_2 ont nécessairement une influence clé. Néanmoins la croissance et la production d'AH (en quantité réduite), ont été démontrées chez *Streptococcus zooepidemicus* dans des conditions de pH et d'oxygénation non régulées (cultures en fioles d'Erlenmeyer) (Chen et al., 2009).

Le milieu de culture issu de la littérature n'est pas exploitable à plus grande échelle (précipitation). Un milieu de culture doit être formulé.

2.2. Formulation et évaluation initiales d'un milieu de culture exploitable à plus grande échelle.

D'un point de vue pratique, des milieux semi-définis sont mis en avant dans la littérature afin « d'optimiser » la production d'AH. La composition de ces milieux est connue en grande partie mais inclut en général des éléments complexes tels que des extraits de levure ou des peptones, en plus du glucose. Ce dernier sert de source d'énergie et éventuellement de carbone en fonction des rapports de concentration avec les peptones et extraits de levure. Le milieu formulé par nos soins devait donc comprendre une source énergétique et carbonée (comme le glucose), une source azotée (peptone) ainsi qu'un ensemble de minéraux essentiels au métabolisme de *Streptococcus zooepidemicus*. De plus, ce milieu, base de nos études, ne devait pas poser de problèmes de précipitation après autoclavage (stérilisation du milieu). En effet, des milieux reproduits de la littérature nous confrontaient à ce genre de problème.

La base nutritive initiale a été définie dans un premier temps (Tableau 2) en se fondant sur les auxotrophies et les besoins élémentaires connus de *Streptococcus zooepidemicus*.

Ainsi, le milieu comprend des facteurs de croissance ($CaCl_2$), des éléments favorisant l'activité microbienne ($NaC_2H_3O_2$, $3H_2O$), des sels pour leur pouvoir tampon (Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4, H_2O ; $NaHCO_3$), une source énergétique et éventuellement carbonée (glucose) ainsi qu'une source azotée (peptone de caséine) afin d'apporter les « briques » élémentaires nécessaires à la production de la biomasse bactérienne et à la synthèse des produits du métabolisme central. Enfin une source de potassium pour favoriser la métabolisation des acides aminés est apportée (K_2HPO_4 ; KH_2PO_4). Les quantités apportées pour chacun des éléments sont basées sur des référentiels issus de la littérature (Kim et al., 1996 ; Patil et al., 2009 ; Nielsen et al., 2009). Pour cette raison le milieu sera baptisé PKN (pour Patil, Kim, Nielsen). Certaines concentrations en sels (de potassium notamment) ont été modifiées dans le but d'obtenir un milieu qui ne sédimente pas après stérilisation. Pour les mêmes raisons, le fer a été exclu de la composition du milieu de culture. De plus, le rôle de la limitation en fer dans la synthèse de la capsule exocellulaire (facteur de virulence) observé chez certaines bactéries Gram négatives telle *Pseudomonas aeruginosa* (Kim et al., 2003) pourrait être un phénomène transférable à des souches encapsulées Gram positives telle que *Streptococcus zooepidemicus*. Une limitation en fer pourrait ainsi permettre de recréer un environnement de « prospection » pour le fer entraînant la production de facteurs de virulence tels que l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*.

Tableau 2. Composition initiale du milieu de culture PKN formulé au cours de cette étude.

Milieu PKN v.1 - 1ère formulation	
Composition en g/L d'eau ultra-pure	
D(+)- glucose ……	20
Peptone de caséine ……	25
$MnSO_4$ ……	0,01
$MgSO_4$ ……	1
K_2HPO_4 ……	0,2
KH_2PO_4 ……	1
$CaCl_2$ ……	0,01
$NaC_2H_3O_2$ ……	4,5

$NaHCO_3$…….....	2,5
NaH_2PO_4, H_2O …….	3,19
Na_2HPO_4 ……..	7,35

Les propriétés nutritives de cette nouvelle base de milieu de culture (milieu PKN, pas de précipitation) ont été étudiées au cours d'une culture à l'échelle du bioréacteur de laboratoire (3 L). Une seule des souches retenues jusqu'alors sera mise en œuvre (souche 10062) pour des raisons pratiques. Ce choix se justifie sur la base d'un critère de performance de croissance. En effet, au cours de l'essai précédent la souche 10062 a permis d'atteindre une concentration maximale cellulaire supérieure aux autres souches.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
30 h	3 L	PKN v.1	37 °C	Contrôlé à 7	0,5 à 1 vvm	300 à 600 tr/mn

Souche mise en œuvre : 10062.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique, d'acide lactique et d'acide formique.

Les données cumulées jusqu'ici, ainsi que les préconisations de la littérature, nous conduisent à réguler le pH à une valeur consigne de 7 (Kim et al., 1996 ; Im et al., 2009 ; Lenormand et al., 2011). La pO_2 est maintenue au-delà d'une valeur seuil de 50 % dans les mêmes conditions que lors des essais précédents. Les cinétiques obtenues sont présentées au niveau de la Figure 1 ci-dessous.

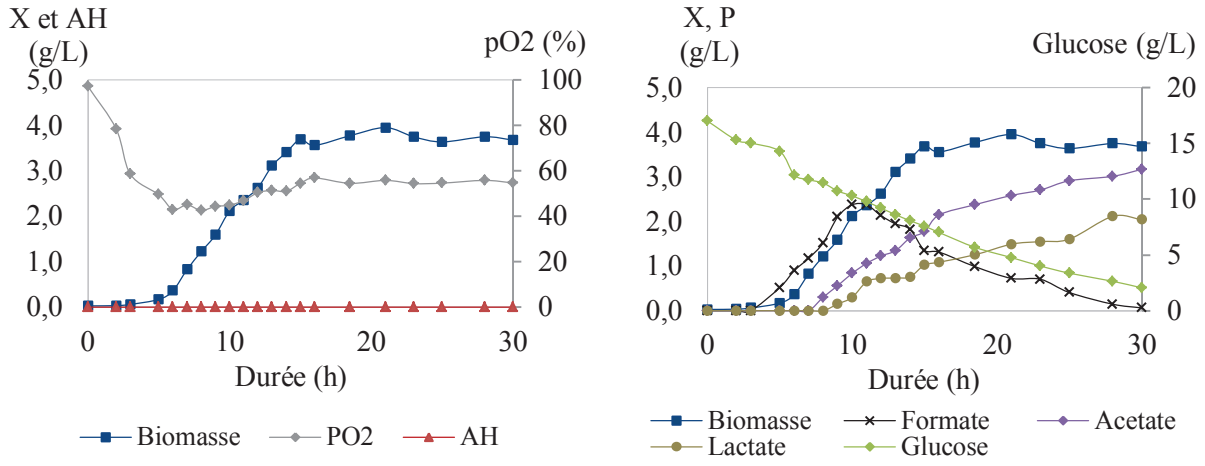


Figure 1. Cinétiques en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 50 %). Souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus.

La régulation du pH à 7, couplée à l'utilisation du milieu de culture nouvellement formulé, entraîne, chez la souche « environnementale » sélectionnée, un phénomène de bascule métabolique significatif. En effet, la production de biomasse se voit multipliée par un facteur 4 (1,2 à 4 g/L). La comparaison avec une culture antérieure en bioréacteur reposant sur la souche 10062 (Tableau 3) montre un transfert des flux métaboliques de la voie centrale (recouvrement catabolique) vers la production de biomasse avec une diminution de la vitesse spécifique maximale de croissance. Cette contribution des facteurs abiotiques à la croissance bactérienne n'a néanmoins aucun effet sur la production finale d'AH. Le métabolisme fermentaire est toutefois modifié. L'acétate n'est plus l'unique produit issu du métabolisme central et le métabolisme fermentaire de la souche devient hétérolactique (production de lactate, d'acétate et de formate). La quasi-totalité du substrat énergétique apporté sous forme de glucose est consommée.

Tableau 3. Recouvrements carbonés et vitesses spécifiques maximales de croissance calculés pour des essais en bioréacteurs Applikon (3L) à partir de la souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus. *Comparaison de deux milieux en conditions de pH régulé et non régulé.*

	10062 (milieu BHI, pH non régulé)	10062 (milieu PKN, pH régulé)
Recouvrement C lié au catabolisme (%)	60	46
Recouvrement C total (%)	89	86
μ_{max} (h^{-1})	0,68	0,56

Une formulation initiale d'un milieu utilisable en pratique a pu être proposée (pas de cristallisation).

Evaluation du milieu : la mise en place d'une culture en bioréacteur à pH régulé et ce, sur la base du nouveau milieu de culture formulé, permet d'observer ici des phénomènes multiples de bascule métabolique chez la souche 10062 de *Streptococcus zooepidemicus*. Nous constatons en effet, (1) un transfert des flux métaboliques de la voie centrale vers la production de biomasse et (2) une bascule vers un métabolisme hétérolactique proche de celui retrouvé chez des organismes producteurs d'AH. Une nécessité de poursuivre la formulation s'impose. Dans une première étape la composition de base du milieu de culture sera maintenue et l'influence du rapport C/N sera étudiée. Des modifications maitrisées dans la composition du milieu de culture mèneront donc logiquement à déséquilibrer les voies métaboliques mises en évidence ici. Des études affinées doivent être mises en place impliquant nécessairement la mise en œuvre de multiples cultures et ce à petite échelle (fioles d'Erlenmeyer). De plus, nous savons que la production d'AH est possible sur ce type de système à pH non régulé (Chen et al., 2009).

2.3. Etude de l'influence du rapport C/N au sein du milieu PKN

Ce rapport carbone/azote fréquemment retrouvée dans la littérature est souvent subjective puisque concrètement, elle prend en considération le glucose comme source de carbone et les peptones et/ou extraits de levure comme sources d'azote. Nous parlerons donc ici de rapport glucose (source énergétique et de carbone)/peptone (source azotée et carbonée). L'influence de la modulation de ce rapport (sur la base du milieu PKN en développement) est étudiée dans la présente étude. La souche 10062 est conservée au titre de modèle d'étude. La pertinence des résultats obtenus sera, par la suite, vérifiée sur les autres souches (ATCC 6580, TDF1 et 11248). Face à la quantité d'essais proposés, les cultures bactériennes sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer (duplicata) et non plus en bioréacteur. Le pH (mesuré hors ligne) et la pO_2 ne seront donc pas régulés. Des cultures de 48 h sont réalisées. Des prélèvements au temps 0, à 4 h, à 23 h et à 47 h sont effectués.

Les différents essais proposés (Tableau 4) incluent deux témoins. L'un à concentration nulle en glucose, l'autre à concentration nulle en peptone. Les autres niveaux ont été définis de

façon arbitraire. Il faut bien prendre conscience que, dans ces essais, différents rapports glucose/peptone seront étudiés sans prendre en considération le facteur concentration. En effet, des rapports identiques peuvent correspondre à des jeux de concentrations différents. Les résultats obtenus suite à la mise en œuvre de ces essais sont présentés dans le Tableau 4 .

Tableau 4. Synthèse des informations apportées suite aux cultures mises en œuvre à partir de la souche 10062 de Streptococcus zooepidemicus *en fioles d'Erlenmeyer dans le cadre de l'étude de l'influence du rapport glucose/peptone sur la synthèse d'AH.*

Concentration en Glucose (g/L)	10	10	10	10	10	0	2,5	5	7,5
Concentration en Peptone de caséine (g/L)	20	15	10	5	0	20	20	20	20
Rapport massique (glucose/peptone)	1 : 2	1 : 1,5	1 : 1	1 : 0,5	10 : 0	0 : 20	1 : 8	1 : 4	1 : 2,7
Recouvrement C lié au catabolisme (%)*	78	68	56	49	x	x	56	94	89
Recouvrement C total (%)*	126	108	90	83	x	∞	320	210	150
X (g/L)	3,1	2,7	2,4	1,6	0,1	2,8	3,9	3,5	2,9
AH (g/L)	0	0	0	0	0	0	0	0,2	0
Glucose $_{consommé}$	8	8,5	8,7	6	0	0	2	4	6,3
Acétate (g/L)	2,7	2,6	2,1	1,2	0	0	0	1,1	2,4
Lactate (g/L)	2,1	1,8	1,6	1,1	0	0,3	1	1,9	1,8

***A noter que les recouvrements carbonés calculés ne prennent en considération que le glucose comme substrat catabolique. Des valeurs dépassant les 100 % seront alors représentatives d'un transfert du métabolisme sur des sources énergétiques plus complexes (peptone de caséine).**

Plusieurs commentaires peuvent être faits à la vue de ces résultats. Tout d'abord, il apparaît que les peptones entrant dans la composition du milieu de culture ont un rôle essentiel dans la croissance chez *Streptococcus zooepidemicus*. En effet, diminuer la concentration en peptone diminue la croissance bactérienne. De plus l'essai témoin (10 : 0) sans addition de peptones permet d'observer à 48 h une $[X]_{max}$ bien inférieure aux autres essais (0,1 g/L). Parallèlement, l'essai témoin sans addition de glucose (0 : 20), permet de porter la concentration maximale en biomasse à 2,8 g/L. Cette tendance est confirmée par le calcul du recouvrement carboné lié à la conversion catabolique du glucose (Tableau 4). Il apparaît qu'en présence de peptone, plus on réduit l'apport du substrat énergétique préférentiel (glucose), plus la bactérie va orienter son catabolisme sur le substrat peptone, moins limitant (Figure 2).

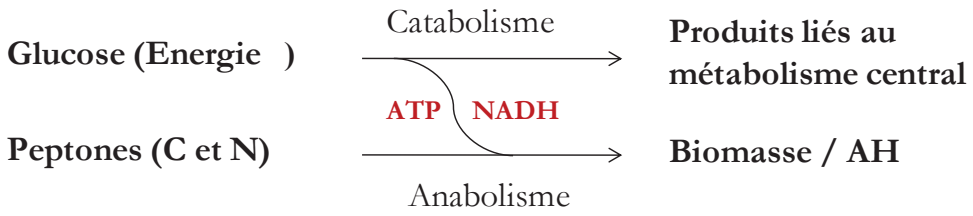


Figure 2. Schéma simplifié des phénomènes de catabolisme et d'anabolisme intervenant chez Streptococcus zooepidemicus.

Une $[X]_{max}$ de 3,9 g/L est atteinte pour un rapport de 1 : 8. Ces résultats mettent clairement en évidence l'importance de l'équilibre entre sources carbonées et sources azotées dans le métabolisme de *Streptococcus zooepidemicus*.

Ensuite, une des conditions de culture (rapport massique de 1 : 4) a permis de mettre en avant une libération dans le milieu de culture de 0,2 g/L d'AH, soulignant une nouvelle fois l'importance d'un rapport maîtrisé en carbone et en azote. Il est important d'insister sur le fait que ce rapport est relatif à des concentrations initiales données (5 g/L de glucose et 20 g/L de peptone). Une production maximale de 3,5 g/L de biomasse est constatée. Il est de même important de noter qu'une relative stabilité du pH est observable et ce uniquement dans ces conditions de culture. Cette ré-alcalinisation du milieu de culture après consommation de la source la plus disponible (glucose) pourrait correspondre à une adaptation du métabolisme cellulaire à un substrat azoté de type « acides aminés » impliquant une libération d'ions ammonium (non dosés).

Une étape annexe a donc consisté à appliquer cette formulation à des cultures des aux autres souches retenues lors de l'étape de criblage (partie « Résultats » - Chapitre II). Ces cultures ont, de même, été réalisées à l'échelle de la fiole d'Erlenmeyer (dupliquées), dans des conditions identiques aux essais précédents (Figure 3).

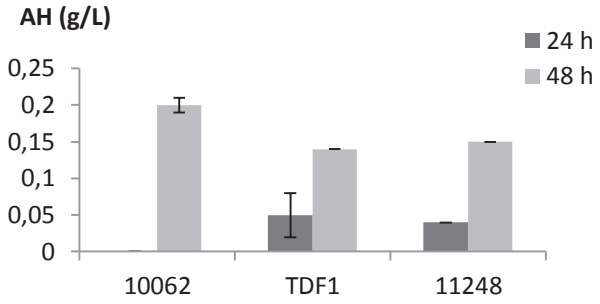


Figure 3. Comparaison des performances de production des souches 10062, TDF1 et 11248 de Streptococcus zooepidemicus *sur la base du milieu de culture PKN nouvellement formulé.*

Le milieu de culture nouvellement formulé (rapport glucose : peptone de 1 : 4) permet d'observer une production d'AH en faible quantité chez les trois souches environnementales retenues jusque-là. La souche 10062 produit la plus grande concentration en AH avec 0,2 g/L. Les « rendements » de production d'AH par g de cellules pour les différentes souches permettent d'observer une tendance différente. En effet, les quantités de biomasse (rapportées par litre de milieu de culture) produites par les souches 10062, TDF1 et 11248 sont respectivement de 3,5 g/L, 1,9 g/L et 2,5 g/L. Les « rendements » correspondant sont de 0,05 g AH/ g X pour la souche 10062 ; 0,07 g AH/ g X pour la souche TDF1 et enfin 0,05 g AH/ g X. Cet écart de 30 % entre la souche 10062 initialement sélectionnée pour cette étude de formulation et la souche TDF1 ne doit pas être négligé. En effet, les « rendements » de production en fonction de la biomasse sont un indicateur d'efficience plus cohérent dans ce cas de métabolisme où les flux orientés vers la production de biomasse et la production d'AH sont très probablement en compétition.

L'importance d'un apport maîtrisé en matière azotée est ici soulignée (rapport massique de 1 :4 pour des concentrations en glucose de 5 g/L et en peptones de 20 g/L). **Une amélioration contrôlée de la composition du milieu de culture doit donc être entamée**. L'importance du contrôle du pH est, de plus, mise en avant au cours de ces essais. La production d'AH, chez des souches environnementales de *Streptococcus zooepidemicus* est donc possible en cultures en fioles d'Erlenmeyer et tend à être améliorée dans des conditions physico-chimiques définies et bien maîtrisées. Dans le cadre de l'amélioration d'un procédé de production, le modèle biologique d'étude présentant les meilleures performances de

production à chaque étape du développement devra être préféré. La souche TDF1 est sélectionnée puisqu'elle permet de travailler dans des conditions en théorie optimales. Les résultats obtenus seront par la suite validés sur les autres souches disponibles.

2.4. Criblage de substrats d'intérêt : approche au « un facteur à la fois »

La suite de cette étude va consister en une amélioration paramétrée de la composition du milieu de culture préalablement défini. Deux phases permettront d'atteindre cet objectif. Nous procéderons tout d'abord à un criblage simple de différentes sources carbonées et énergétiques, différentes sources azotées ou encore différents apports complémentaires pouvant avoir une influence sur la production d'AH. La réponse attendue est, dans le cas de cette étape de criblage, de type binaire. Soit il y a une amélioration de la concentration maximale d'AH produite, soit il n'y en a pas. La seconde phase consistera, sur la base des résultats du criblage, en l'étude de l'effet croisé entre les différents facteurs (éléments nutritifs) ayant un impact positif sur la production d'AH. Ces interactions seront étudiées au moyen d'un plan d'expériences. Au vu des « rendements » de production d'AH par g de biomasse obtenus, la souche 10062 est substituée par la souche TDF1 afin de conduire ces étapes de développement de procédé dans des conditions considérées comme les meilleures. Le milieu PKN conserve quant à lui la même composition que celle décrite au Tableau 2 à la différence que la concentration retenue en glucose est de 5 g/L (au lieu de 20 g/L) et celle en peptone est de 20 g/L (au lieu de 25 g/L).

Sur la base d'études issues de la littérature (Kim et al., 1996 ; Armstrong et al., 1997 ; Lai et al., 2009) et d'examens complets des compositions de chaque peptone et extrait de levure pouvant nous intéresser dans ce cadre de synthèse d'AH, une sélection de différents substrats d'intérêt pour la production d'AH a été faite. Ainsi différentes sources énergétiques et carbonées en substitut du glucose mais aussi différentes sources azotées voire soufrées, de compositions élémentaires différentes, en substitut de la peptone de caséine (base azotée du milieu PKN) ont été évaluées. Parmi les peptones et extraits de levure retenus, une peptone de colza (LRGP) a été extraite, purifiée et conditionnée au laboratoire. Les essais de criblage ont été réalisés en fioles d'Erlenmeyer dans des conditions identiques à celles décrites précédemment (duplicata). Les Tableau 5, Tableau 6 et Tableau 7 présentent les résultats de

la production d'AH en g/L, de biomasse en g/L ainsi que le « rendement » d'AH par rapport à la biomasse en mg d'AH/ g de biomasse.

Sources énergétiques (et carbonées).

Tableau 5. Résumé des résultats obtenus par substitution du glucose dans le cadre de l'étude au « un facteur à la fois » à partir de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.

		Production AH (g/L)	« Rendement » (mg AH/ g X)	Biomasse (g/L)
Témoin	Milieu PKN	**0,14**	**70**	**1,05**
Substitution du glucose par	Saccharose	0,07	55	1,40
	Lactose	0	0	0,46

Nous pouvons constater que la production en AH est très faible dans le cas d'une substitution du glucose par le saccharose. Elle est nulle en ce qui concerne le lactose. Le glucose doit donc être conservé comme source énergétique et carbonée de référence.

Substrats azotés complexes

Tableau 6. Résumé des résultats obtenus par substitution du glucose dans le cadre de l'étude au « un facteur à la fois » à partir de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.

		Production AH (g/L)	« Rendement » (mg AH/ g X)	Biomasse (g/L)
Témoin	Milieu PKN	**0,14**	**70**	**1,05**
Substitution de la peptone de caséine par	Peptone de blé E1	0,07	145	0,51
	Peptone de soja E110	**0,37**	**300**	**1,20**
	Peptone de caséine K3	0	0	0,18
	Primatone P37	0,08	57	1,30
	Peptone 4601N	0,13	124	4,00
	Peptone de soja	0,20	271	0,72
	Peptone de colza (LRGP)	**0**	**0**	**0,07**
	Y/E 412	**0,24**	**190**	**1,20**
	Y/E 413	0,02	10	1,90
	Y/E 444	**0,22**	**223**	**0,97**

L'utilisation de peptone de soja E110 (Organotechnie) ainsi que des extraits de levure 412 et 444 (Kerry) permettent d'obtenir séparément des concentrations plus importantes en AH libre dans le milieu de culture à 48 h. La peptone de colza produite au laboratoire dans le cadre de ces travaux ne permet pas de produire d'AH. La croissance est de plus très limitée avec ce substrat, soulignant une nouvelle fois l'importance de la source azotée dans le métabolisme de *Streptococcus zooepidemicus*. En complément, si nous nous référons aux résultats de « rendement » AH/X (g/g), il apparaît clairement que la peptone de soja joue un rôle dans le métabolisme de production de l'AH. La peptone de soja E110 (Organotechnie) sera sélectionnée pour la suite de l'étude puisqu'elle permet d'atteindre avec la souche TDF1 une meilleure production d'AH (0,37 g/L pour une valeur témoin de 0,14 g/L environ) ainsi que des « rendements » en AH/biomasse plus importants (300 mg AH/g de biomasse pour une valeur témoin de 131 mg AH/g de biomasse). Dans le même sens, nous pouvons constater que la substitution d'une partie de la peptone de caséine (milieu de base PKN) par de l'extrait de levure augmente la production d'AH. Celle-ci a, en effet, presque doublé en atteignant près de 0,24 g/L pour l'extrait de levure 412 et 0,22 g/L pour l'extrait de levure 444. Ce dernier sera néanmoins sélectionné comme source azotée et vitaminée pour les études à venir puisqu'il présente un « rendement » AH/biomasse de 220 mg/g contre 190 mg/g avec l'extrait de levure 412.

Compléments

Tableau 7. Résumé des résultats obtenus par ajout de complément au milieu PKN dans le cadre de l'étude au « un facteur à la fois » pour la formulation d'un milieu de culture à partir de la souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.

		Production AH (g/L)	« Rendement » (mg AH/ g X)	Biomasse (g/L)
Témoin	Milieu PKN	**0,14**	**70**	**1,05**
Complément au milieu PKN	Méthionine	0,12	138	0,84
	Glutamine	0,02	30	0,68
	Tween 80	0,07	51	1,30
	Vitamines	0,13	107	1,20

Aucun des éléments référencés dans le Tableau 7 ne permet, par addition au milieu de culture PKN, d'améliorer la production d'AH (g/L) en comparaison au témoin. Ces « compléments » sont donc écartés dans le cadre de cette étude. Leur utilisation n'est, pour

autant, pas exclue puisque cette étude de criblage ne tient pas compte des concentrations et des effets croisés entre les différents constituants du milieu.

Des données plus ciblées, relatives au métabolisme de synthèse de l'AH, sont présentées au niveau du Tableau 8. Les données sont classées par ordre d'effet croissant sur la base du « rendement » d'AH par g de biomasse. Une étude plus approfondie de la composition de chaque substrat apporté (notamment en soufre) a permis de faire ressortir certaines tendances.

*Tableau 8. Synthèse des données relatives aux essais au « un facteur à la fois » ayant permis d'observer une amélioration significative de la production d'AH. *Les rapports C/S et N/S ont été calculés à partir de la composition en acides aminés des lots de peptones et d'extrait de levure utilisés ainsi qu'à partir de la composition globale des différents milieux de culture.*

Milieu	PKN (Témoin)	Méthionine	YE412	YE444	Peptone de soja	Peptone de soja E110
AH produit (g/L)	0,14	0,12	0,24	0,22	0,20	0,37
« Rendement » AH/X (mg/g)	70	140	190	220	270	300
Production acétate (g/L)	1,1	1,8	2,0	2,1	1,6	1,8
Production lactate (g/L)	1,9	0,7	0,4	0,7	0,6	1,5
Rapport massique initial $C/S_{minéral}$*	125	104	66	59	35	33
Rapport massique initial $C/S_{organique}$*	78	76	144	186	319	623
Rapport massique initial $N/S_{minéral}$*	30	26	13	13	6	7
Rapport massique initial $N/S_{organique}$*	19	19	29	41	57	139

D'un point de vue métabolique, nous pouvons constater que, dans chacun des cas où une amélioration de la production d'AH est observée, l'acétate est le produit majoritaire par rapport au lactate. De plus, nous pouvons observer qu'il existe une corrélation entre la quantité de soufre organique et minéral présente dans chaque milieu de culture et la production d'AH (Tableau 8).

La Figure 4 permet de montrer de manière explicite qu'il existe bien une relation de type exponentielle ou exponentielle inverse, entre le taux de soufre organique ou minéral apporté aux cellules et la production d'acide hyaluronique.

Document confidentiel

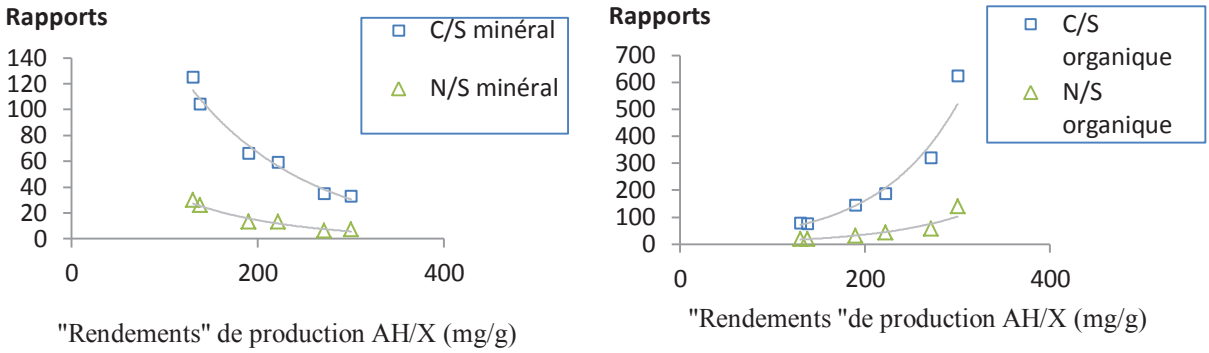


Figure 4 Courbes exprimant la relation entre les rations C/S et N/S et la production d'AH

Nous pouvons constater que l'apport en soufre minéral permet d'augmenter le « rendement » de production d'AH par g de biomasse. Un phénomène inverse est constaté lorsque l'on augmente la proportion de soufre organique par rapport aux substrats énergétiques, carbonés et azotés dans le milieu de culture.

Une explication peut se trouver dans le fait que la production d'acétate couplée à la production de biomasse et d'AH entraîne une accumulation de $NADH+H^+$ au sein de la cellule (partie I « Etude bibliographique », schéma du métabolisme de *S. zooepidemicus*). De plus, l'obtention d'une forme oxydée de ces cofacteurs n'est pas favorisée par de faibles productions en acide lactique. Ainsi, l'équilibre rédox au sein de la cellule tend à devoir s'équilibrer. Deux phénomènes peuvent co-intervenir dans ce cas (Figure 5). Le faible apport en oxygène assuré au cours de la culture en fioles d'Erlenmeyer limite l'intervention de la NADH oxydase (NOX). Le seul système de compensation pouvant alors rentrer en jeu serait, par voie de conséquence, lié à une limitation en soufre organique au sein de la cellule bactérienne. En effet, la réduction anabolique des sulfates est utilisée dans la biosynthèse des acides aminés et des protéines et implique un besoin d'énergie sous forme d'ATP et de coenzymes réduits (maintien du potentiel rédox). Le sulfate inorganique est réduit en sulfite (SO_3^{2-}) puis en sulfure d'hydrogène (H_2S). La cystéine peut alors être synthétisée à partir de H_2S et de sérine en deux étapes. Dans un premier temps, l'acétyl-sérine est formée à partir de l'acétyl-CoA (groupement acétyle transféré à la sérine). Dans un second temps, le H_2S déplace le groupement acétyle pour former la cystéine. Ce soufre organique serait dans ce cas synthétisé soit en lien avec un besoin élémentaire de la bactérie en acides aminés soufrés, soit synthétisé par défaut dans le but de rééquilibrer la balance rédox au sein de la cellule dans le cas de figure où le maintien d'un environnement oxydatif serait limité.

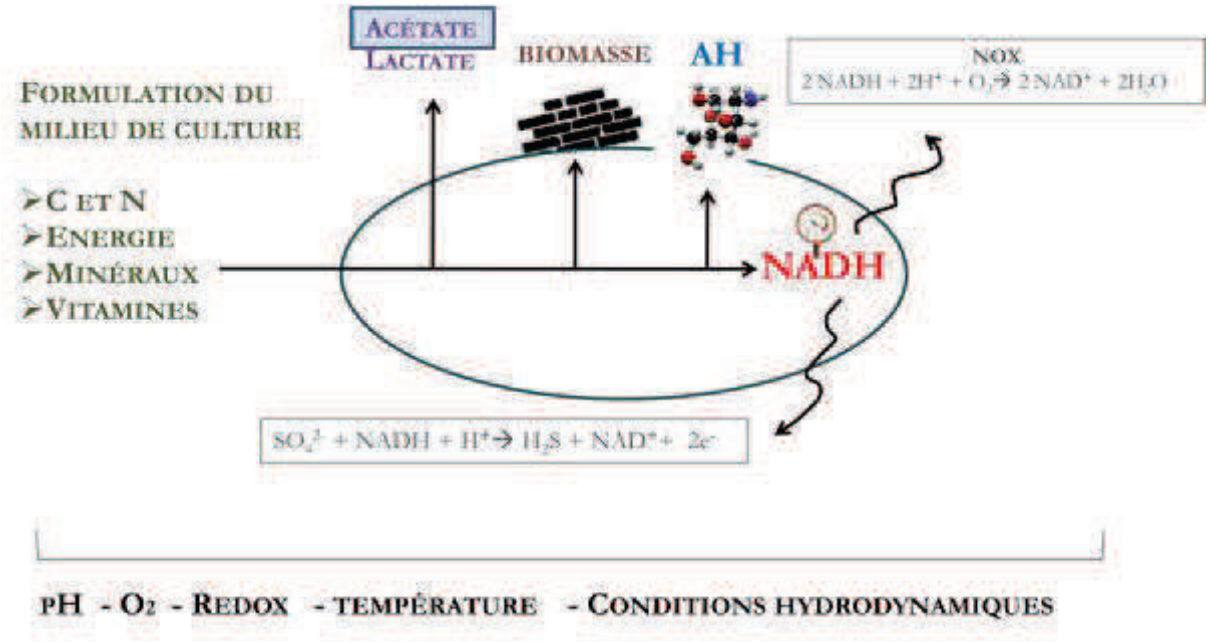


Figure 5. Schéma synthétique des phénomènes d'équilibre du potentiel d'oxydo-réduction pouvant intervenir chez Streptococcus zooepidemicus *au cours d'une mise en culture.*

La production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus* serait donc largement corrélée à l'environnement oxydo-réductif imposé par les conditions physico-chimiques environnantes (milieu de culture, aération …). Le rôle clé de l'oxygénation est donc ici confirmé. D'un point de vue pratique, si le transfert O_2 s'avérait insuffisant au sein d'un système de mise en œuvre d'une culture de *Streptococcus zooepidemicus* (exemple de la fiole d'Erlenmeyer), une correction serait possible par addition de soufre sous forme minérale. Toutefois, cet ajustement se fera au risque de ralentir les cinétiques (assimilation du soufre minéral parfois lente) et de diminuer, à terme, les niveaux de production (assimilation du soufre minéral consommatrice en énergie et en acétyl-CoA) avec une perte potentielle d'une forte part du glucose qui est à la fois source d'énergie et de carbone pour la production d'AH.

Un crible de sélection de différentes sources carbonées, énergétiques et azotées ayant un impact sur la production d'AH en fioles d'Erlenmeyer chez la souche TDF1 de *Streptococcus zooepidemicus* a été mis en place. Les substrats azotés et carbonés d'intérêt ont été sélectionnés (Extrait de levure 412 et 444, Peptones de soja). Le glucose est conservé en tant que source énergétique et éventuellement carbonée (témoin PKN).

Milieu	PKN (Témoin)	YE412	YE444	Peptone de soja	Peptone de soja E110
AH produit (g/L)	0,14	0,24	0,22	0,20	0,37
"Rendement" AH/X (mg/g)	140	190	220	270	300
% de S_{org} dans la source azotée	0,72	0,27	0,19	0,13	0,06

En complément, la comparaison des différents essais a permis de mettre en avant l'importance de l'environnement oxydo-réductif et énergétique dans le cadre de la synthèse d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*. Des substrats pauvres en soufre organique sont de plus privilégiés (tableau ci-dessus). En effet, l'impact du soufre organique et minéral sur la production d'AH a pu être soulevé. Cette conclusion intervient dans des cas où l'oxygénation et donc les systèmes de régulation du rédox feraient défaut (exemple de systèmes de cultures multiples et peu contrôlés comme les fioles d'Erlenmeyer).

2.5. Amélioration de la composition du milieu de culture en utilisant les substrats précédemment sélectionnés

Cette seconde étape fait suite à une étape de criblage qui aura permis de sélectionner différents substrats énergétiques, carbonés et azotés ayant une influence sur la réponse de production d'AH microbien. Dans cette étude nous chercherons à définir des jeux de concentrations les meilleures dans le cadre imposé par la démarche suivie pour l'amélioration de la production d'AH.

La souche TDF1 est conservée au titre de modèle d'étude. Les essais sont poursuivis à l'échelle de la fiole d'Erlenmeyer (en duplicata). Par conséquent, l'aération reste non

maîtrisée et aucune démarche cognitive, basée sur la régulation du rédox ou du niveau d'oxygènation, ne peut être entamée. En effet, les conditions d'aération et ainsi, le transfert d'oxygène tendront à être différents à l'échelle du bioréacteur et à l'échelle industrielle impliquant un niveau différent d'action de la NADH oxydase. Une démarche de planification expérimentale est alors préférée.

Le plan défini sous le logiciel MODDE9 est un plan composite à faces centrées à 3 facteurs et 3 niveaux (Tableau 9). Trois réponses seront étudiées par analyse de surface (RSM) : la production finale de biomasse, la production maximale d'AH ainsi que les « rendements » de production d'AH par g de biomasse. La résolution du plan d'expériences se fera selon un modèle de type quadratique. Les conditions de mise en œuvre restent les mêmes en ce qui concerne les autres facteurs (volume, température, agitation, pH, base de milieu PKN).

Au cours de l'étude précédente, deux facteurs influant significativement sur la production d'AH ont pu être mis en avant : la peptone E110 et l'extrait de levure 444. Le glucose a été conservé comme facteur de référence.

Tableau 9. Structure du plan d'expériences pour l'optimisation de la composition du milieu de culture en fioles d'Erlenmeyer pour la production d'AH chez Streptococcus zooepidemicus.

Facteurs	Niveaux		
	-1	**0**	**1**
Glucose (g/L)	5	10	15
Extrait de levure 444 (g/L)	10	20	30
Peptone de soja E110 (g/L)	5	10	15

Nous pouvons observer, dans le Tableau 10, les réponses obtenues (concentration en AH finale, biomasse produite et « rendements » de production), pour les 17 essais réalisés, après 48 h de culture. Nous pouvons constater que les essais n° 3, 7 et 9 présentent les productions d'AH les plus importantes (concentrations et« rendements » maximaux). L'essai n°7 correspond à la condition la plus favorable pour la production d'AH avec une concentration de 0,44g/L et des « rendements » de 250 mg d'AH par g de biomasse. Cette condition correspond à un niveau bas (5 g/L) en glucose, un niveau haut (15 g/L) en peptone de soja et

Document confidentiel

un niveau haut (30 g/L) en extrait de levure. Le centre du domaine est l'essai du plan d'expériences correspondant à la condition [0; 0; 0]. Celle-ci a été répétée 3 fois (essais n° 15, 16, 17) afin d'estimer l'erreur expérimentale. Dans le Tableau 10, nous pouvons constater que les valeurs des réponses (production d'AH et biomasse) présentent un écart-type très faible. L'erreur due à l'expérimentateur et au mode opératoire retenu n'est donc pas significative.

Tableau 10. Bilan des réponses obtenues pour la production d'AH et la production de biomasse suite à la réalisation d'un plan d'expériences à trois facteurs et trois niveaux.

Essai n°	$C_{Glucose}$ (g/L)	$C_{Peptone}$ (g/L)	$C_{Extrait\ de\ levure}$(g/L)	$[X]_{finale}$(g/L)	Concentration finale en AH (g/L)	« Rendement »AH/X (mg d'AH/ g de biomasse)
1	5	5	10	1,50	0,00	0
2	15	5	10	1,10	0,17	150
3	**5**	**15**	**10**	**2,10**	**0,34**	**160**
4	15	15	10	1,50	0,04	20
5	5	5	30	1,40	0,10	70
6	15	5	30	0,90	0,14	160
7	**5**	**15**	**30**	**1,80**	**0,44**	**250**
8	15	15	30	1,60	0,08	50
9	**5**	**10**	**20**	**1,75**	**0,41**	**240**
10	15	10	20	1,10	0,06	60
11	10	5	20	1,00	0,12	130
12	10	15	20	1,67	0,06	40
13	10	10	10	1,10	0,17	140
14	10	10	30	1,10	0,27	250
15	10	10	20	1,30	0,23	170
16	10	10	20	1,10	0,22	200
17	10	10	20	1,05	0,23	200

Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les réponses [AH], [X] et « $Y_{AH/X}$ » sont respectivement de 0,85 et 0,95 et 0,82 (Figure 6). Ces résultats sont largement acceptables concernant la biomasse mais montrent que la modélisation quadratique n'explique qu'à 86 et 83 % les valeurs de production d'AH (concentrations maximales et « rendements » de production). Ce résultat plus mitigé pour l'AH que pour la biomasse est cependant logique. En effet, les régulations liées à la biosynthèse de l'AH ne sont que partiellement connues. Il est ainsi plus que probable qu'un ou plusieurs facteurs autres que les variables étudiées jouent

un rôle clé dans le mécanisme de production d'acide hyaluronique par *Streptococcus zooepidemicus*.

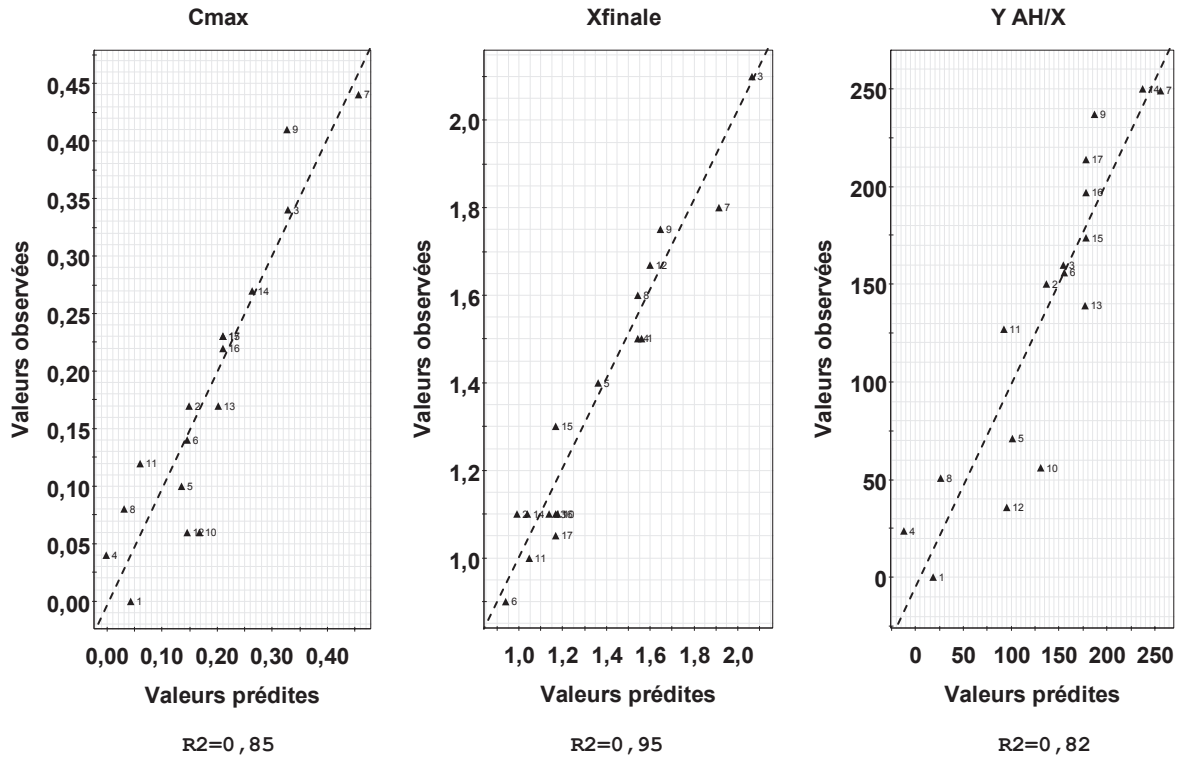


Figure 6. Expression des valeurs observée en fonction des valeurs prédites par le modèle et R² associés.

Les résultats suivants (Figure 7) permettent de décrire l'influence croisée des trois facteurs étudiés sur les réponses « production de biomasse », « production d'AH » et les « rendements » de production qui en découlent. Nous pouvons constater que l'application d'un niveau intermédiaire en extrait de levure, haut en peptone et bas en glucose favorise la formation de biomasse (Figure 7A). Parallèlement, des niveaux hauts en extraits de levure et en peptone sont favorables à la production d'AH (concentrations maximales et « rendements »). Il existe, de plus, un effet synergique, sur ces réponses, qui est lié à l'ajout associé de peptone et d'extrait de levure. Enfin, des concentrations basses en glucose sont préconisées pour une amélioration des réponses relatives à la production d'AH (Figure 7B et C).

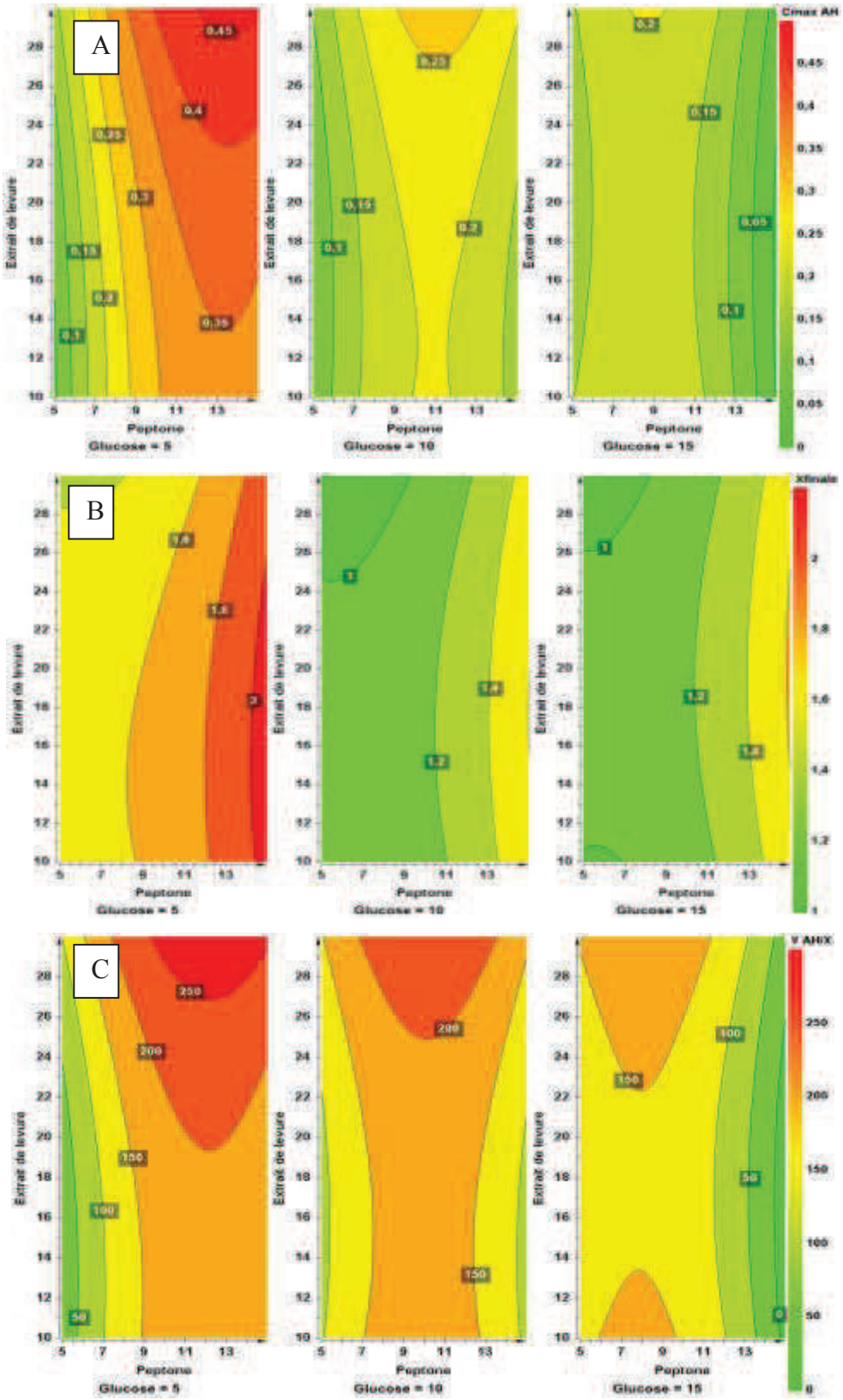


Figure 7. Surfaces de réponses obtenues par résolution du plan d'expériences pour déterminer l'influence des facteurs « concentration en glucose », « concentration en peptone de soja E110 » et « concentration en extraits de levure 444 » sur la production d'AH (A= C_{max} en g/L et C= $Y_{AH/X}$ en mg/g) et de biomasse en g/L (B).

Document confidentiel

Une approche d'amélioration multicritère assistée par le logiciel MODDE9 nous a permis d'obtenir les résultats présentés au niveau de la Figure 8 ci-dessous. Considérant, d'une part, les résultats obtenus lors de ce plan d'expériences et, d'autre part, la compétition métabolique potentielle entre production d'AH et production de biomasse, une composition de milieu de culture est proposée dans l'optique de maximiser la réponse « production d'AH » tout en minimisant la réponse « production de biomasse ».

Une concentration de 0,47 g/L en AH pourrait ainsi théoriquement être atteinte pour une concentration en glucose de 5 g/L, en extrait de levure de 30 g/L et en peptone de 13,8 g/L.

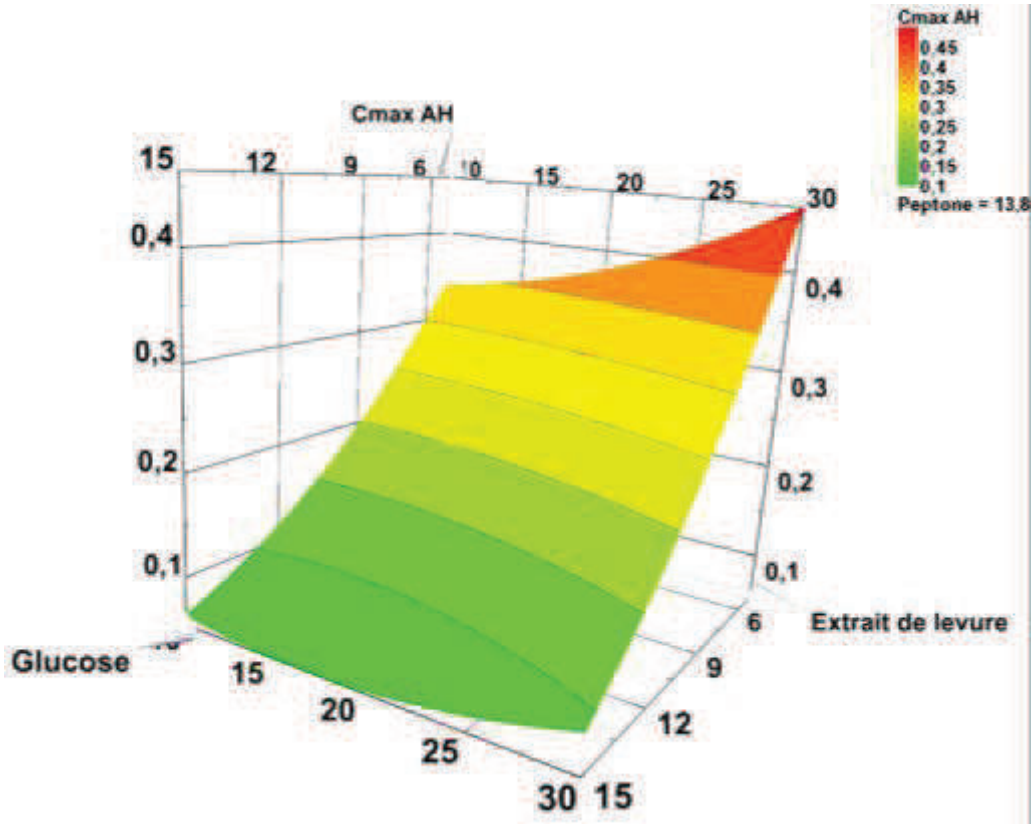


Figure 8. Représentation graphique de la surface de réponses obtenue en étudiant l'influence de la concentration en glucose et de la concentration en extraits de levure 444 pour un niveau de concentration en peptone de soja E110 fixé à 13,8 g/L (paramètre optimisé).

Document confidentiel

Une première base de milieu de culture présentant tous les nutriments nécessaires à la croissance de *Streptococcus zooepidemicus* a pu être formulée. Ce milieu est, de plus, exploitable dans le cadre d'une extrapolation à plus grande échelle (pas de contrainte de précipitation du milieu après stérilisation). Une production d'AH de l'ordre de 0,15 g/L a pu être obtenue à partir de la souche TDF1. Ces résultats ont souligné l'importance de l'ajout, à la composition du milieu de culture, d'une source azotée de composition spécifique.

Dans une optique générale de recherche de sources nutritionnelles adéquates et de formulation « optimale » du milieu, nous avons tout d'abord réalisé une étude selon une approche au « un facteur à la fois ». Nous avons pu constater que la source d'énergie et éventuellement de carbone qui permettait la meilleure production d'AH était le glucose. Les sources azotées et carbonées retenues pour leur capacité d'amélioration de la production d'AH, étaient la peptone de soja E110 et l'extrait de levure YE444. Les interactions entre les niveaux d'apports de ces trois éléments nutritifs ont ensuite pu être étudiées grâce à la réalisation d'un plan d'expériences par la méthode de surfaces de réponse. Les réponses apportées ont permis de conclure qu'une maximisation de la production d'AH impliquait, dans nos conditions, un apport en glucose à un « niveau bas » et un apport en peptone de soja et en extrait de levure à un « niveau haut ».

De plus, les données fournies par ces essais permettent d'avancer que la production d'AH, chez *Streptococcus zooepidemicus,* serait corrélée à l'environnement oxydo-réducteur imposé par les conditions physico-chimiques environnantes (milieu de culture, aération). Dans les faits, il a été démontré qu'une action sur les concentrations initiales apportées en soufre minéral et en soufre organique pouvait permettre de contrebalancer cet équilibre d'oxydo-réduction dans des cas de systèmes de culture faiblement aérés. D'un point de vue pratique l'étude de l'influence de facteurs abiotiques extrapolables à plus grande échelle tels que le transfert en oxygène devra être préférée (influence sur l'équilibre rédox par oxydation du NADH en excès).

2.6. Validation du milieu formulé

Les essais suivant visent à valider la composition de milieu définie après résolution du plan d'expériences (paragraphe 2.5 du présent chapitre), d'une part avec la souche TDF1

ayant servi de modèle d'étude pour les essais précédents et, d'autre part, avec les autres souches environnementales et de référence disponibles. Les cultures ont en premier lieu été mises en œuvre en fioles d'Erlenmeyer dans des conditions identiques aux essais précédents. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 11. Aucun démarrage de la croissance bactérienne n'a pu être constaté pour la souche 11053 de *Streptococcus zooepidemicus*. Les résultats relatifs à cette souche ne sont donc pas inclus.

Tableau 11. Evaluation des performances des souches environnementales et de référence cultivées dans le milieu PKN optimisé.

Milieu	**PKN (Glucose 5 g/L ; Peptone de soja 13,8 g/L ; Extrait de levure 30 g/L)**							
Souche	TDF1-témoin (résultats plan d'expériences)	TDF1	11248	10062	ATCC6580	2398	5389	6439
AH Produit (g/L)	0,44	0,49	0,39	0,15	0,01(5)	0	0,05	0
« Rendement » de production (mg AH/g X)	250	330	270	50	80	0	40	0
Biomasse (g/L)	1,80	1,51	1,45	2,86	1,77	1,18	1,13	1,47

Les résultats montrent que le milieu formulé, suite à l'optimisation multicritère partielle effectuée sous MODDE9, permet bien d'améliorer la production d'AH tout en réduisant la quantité de biomasse produite. Ceci se traduit donc par une amélioration nette du « rendement » d'AH produit par g de cellules (250 mg/g pour le témoin et 330 mg/g après amélioration). De plus, les résultats montrent que la souche 11248 possède aussi un potentiel intéressant concernant la production d'AH, potentiel qui n'avait pas été mis en évidence à partir du milieu formulé initialement. En parallèle, la souche ATCC 6580 (souche productrice de référence) ne permet pas d'observer des « rendements » de production d'AH équivalents.

Une nouvelle formulation du milieu de culture a pu être définie (tableau résumé ci-dessous). La souche 11248 ainsi que la souche modèle TDF1 sont sélectionnées pour une évaluation cinétique de leurs performances en bioréacteur sur la base de ce milieu. Une régulation pH à 7 pourra aussi être envisagée puisque sur chacun des essais où une production d'AH est constatée, le pH est naturellement régulé autour de 7 (résultats non présentés) en lien avec une bascule entre consommation de glucose (production d'acides organiques) et métabolisation de la source azotée (libération d'ions ammonium).

Document confidentiel

Milieu PKN v.2 – 2ème formulation	
Composition en g/L d'eau ultra-pure	
D(+)- glucose	5
Peptone de soja E110	13,8
Extrait de levure 444	30
$MnSO_4$	0,01
$MgSO_4$	1
K_2HPO_4	0,2
KH_2PO_4	1
$CaCl_2$	0,01
$NaC_2H_3O_2$	4,5
$NaHCO_3$	2,5
NaH_2PO_4, H_2O	3,19
Na_2HPO_4	7,35

Les propriétés nutritionnelles validées en cultures à petite échelle de cette nouvelle base de milieu de culture PKN ont alors été étudiées au cours d'une culture à l'échelle du bioréacteur (3 L) permettant un suivi cinétique plus approprié. Les souches TDF1 et 11248, dont les capacités de production d'AH ont été démontrées avec ce milieu, sont retenues pour ces essais. Le pH est régulé à une valeur consigne de 7. La pO_2 mesurée est maintenue au-delà d'une valeur limite basse de 50 %.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
56 h	3 L	PKN v.2	37 °C	Contrôlé à 7	0,25 à 1 vvm	400 tr/mn

Souches mises en œuvre : TDF1 et 11248.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique.

Les cinétiques obtenues au cours de ces essais sont présentées au niveau des Figure 9 etFigure 10.

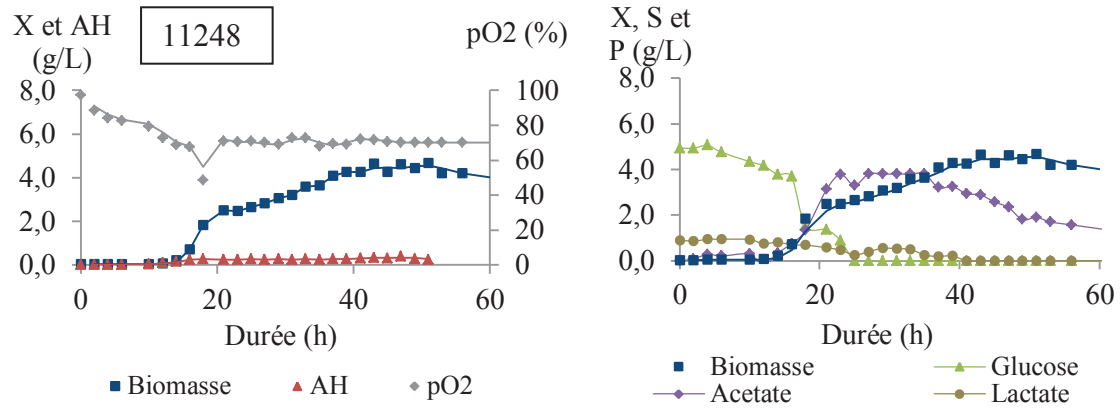


Figure 9. Cinétiques en bioréacteur Applikon (3L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 50 %). Souche 11248 de Streptococcus zooepidemicus.

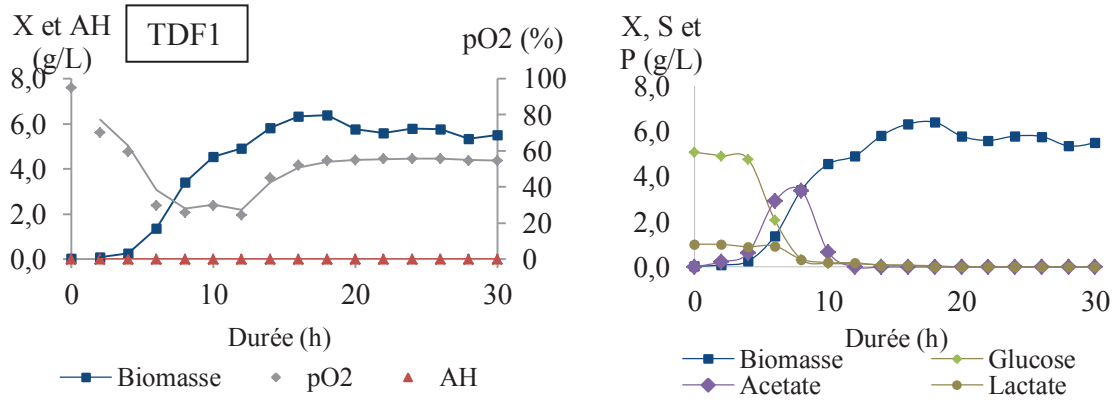


Figure 10. Cinétiques en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 50 %). Souche TDF1 de Streptococcus zooepidemicus.

Aucune production d'AH n'est observée avec la souche TDF1 suite au dosage CTAB sur les surnageants de culture bactérienne (résultats inférieurs à 0,1 g/L). Pour la souche 11248, une production maximale de 0,3 g/L est obtenue. Ces valeurs sont inférieures aux cultures en fioles d'Erlenmeyer malgré le contrôle de paramètres clés tels le pH et l'oxygénation. Afin d'écarter l'hypothèse d'une action éventuelle des hyaluronidases au cours de la production microbienne, un essai de révélation d'activité sur gélose à l'AH a été réalisé. Cette technique, décrite dans le Chapitre I de la partie « Résultats », permettra de déceler une éventuelle digestion enzymatique se traduisant par l'apparition d'un halo clarifié autour des zones de dépôt de l'échantillon. Pour chacun des essais, un échantillon de surnageant a été récupéré en fin de culture. Un concentrat protéique (0,1 g/L) est obtenu après ultrafiltration et diafiltration (retentat). Ces échantillons ont servi pour les essais sur gélose à l'AH. Les résultats présentés Figure 11, ne permettent pas de mettre en évidence une quelconque activité hyaluronidasique.

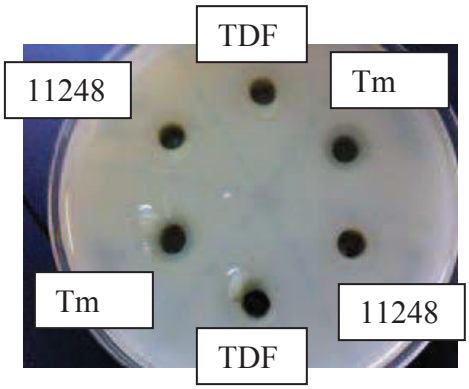


Figure 11. Recherche de l'activité hyaluronidasique à partir de concentrats protéiques issus des cultures en bioréacteur des souches TDF1 et 11248 de Streptococcus zooepidemicus.

L'absence de production d'AH (souche TDF1) ou la faible production d'AH (souche 11248) pourrait donc s'expliquer par une dérive des flux métaboliques vers la production de biomasse (4,7 et 6,4 g/L respectivement pour la souche 11248 et TDF1 pour 1,5 g/L environ dans des cultures en fioles d'Erlenmeyer). Nous pouvons mettre en évidence ici un phénomène net de compétition métabolique puisque plus la souche produit de la biomasse, moins elle produit d'AH. L'activité catabolique et anabolique de ces deux souches à pH 7 est de plus très atypique puisque dans les deux cas, une fois que le milieu de culture se retrouve limitant en glucose, les cellules basculent vers un substrat inattendu, l'acide acétique. En effet, une diminution de la concentration en acide acétique produit succède à la consommation du glucose. Cette consommation d'acide acétique peut s'expliquer par une transition vers la voie anabolique du glyoxylate se traduisant par une conversion de cet acide acétique en acétyl-CoA. Ce cycle anabolique est retrouvé chez *Streptococcus zooepidemicus* (Référence wébographique : KEGG).

Ces derniers résultats en bioréacteurs mettent en avant des contraintes quant au développement du procédé de production d'AH. En effet, un milieu de culture adapté aux besoins métaboliques de *Streptococcus zooepidemicus* a pu être formulé. Une production de l'ordre de 0,5 g d'AH par litre de milieu de culture a ainsi pu être obtenue dans des conditions non optimales (fioles d'Erlenmeyer). La réalisation d'essais finaux en bioréacteur, dans des conditions d'aération, de pH et de température en accord avec les conditions physiologiques retenues pour la production d'AH et celles retrouvées dans la littérature, n'a pas permis d'améliorer cette production chez des souches « environnementales ». Ces essais peu concluants à l'échelle du bioréacteur nous conduisent, pour une ultime étape de

formulation, à basculer vers une démarche plus cognitive. En complément, un changement de la souche de référence est envisagé. (partie « Résultats » - Chapitre II)

3. Etude complémentaire basée sur une réorientation des flux métaboliques

Une mise en œuvre à l'échelle du bioréacteur n'a pas permis d'améliorer, voire même d'atteindre, les « rendements » de production d'AH obtenus avec un système à petite échelle en fioles d'Erlenmeyer. Une étape finale de formulation du milieu de culture a donc été envisagée afin d'améliorer cette production d'AH.

L'objectif de cette étude consistera à définir, dans un premier temps, les précurseurs et les flux métaboliques majeurs intervenant au cours de la production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus,* pour ensuite, en déduire une démarche cognitive viable permettant une réorientation des flux métaboliques vers la production d'AH. Dans un second temps, cette base d'informations servira à la mise en place d'essais sur la base d'une planification expérimentale.

Les essais à l'échelle de la fiole d'Erlenmeyer, ainsi que les données de la littérature, mettent en avant que le glucose est un substrat énergétique et potentiellement carboné important intervenant au cours de la synthèse d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*. De faibles concentrations sont préconisées, pour une amélioration de la synthèse d'AH en fioles d'Erlenmeyer, si nous considérons les résultats obtenus. Ces concentrations sont malgré tout uniquement indicatives puisque même s'il a été démontré que l'application d'un certain « rapport C/N » pouvait jouer un rôle au cours de cette synthèse, l'effet réel de la concentration initiale en glucose n'a pas pu être convenablement exploré.

En considérant la voie de conversion du glucose en AH (partie I « Etude bibliographique », schéma du métabolisme de *S.zooepidemicus*), il apparaît que la synthèse de l'exopolysaccharide va nécessiter, en complément du carbone issu du glucose, de l'énergie sous forme d'ATP, de l'acétyl-CoA et de la glutamine. Le bilan suivant peut être dressé :

$$\mathbf{2\ Glc + 4\ ATP + 1\ Gln + AcCoA \rightarrow 2\ NADH, H^+ + AH}$$

Document confidentiel

D'un point de vue énergétique et en termes d'oxydo-réduction, cette équation est déséquilibrée et ne considère pas les sources réelles de carbone et d'azote nécessaires.

La synthèse d'une molécule d'acétylCoA va nécessiter l'utilisation d'1/2 glucose si l'on se réfère à l'équation suivante.

$$\mathbf{Glc + 2\ ADP + 2\ Pi + 2\ CoA + 4\ NAD^+ \rightarrow 2\ Acétyl\text{-}CoA + 4\ NADH, H^+ + 2\ CO_2 + 2\ ATP + 2\ H_2O}$$

L'intégration de la glutamine va, pour sa part, impliquer sa régénération à partir d'ions ammonium et de coenzymes d'oxydo-réduction NADPH, H^+.

$$\mathbf{Glu + NH_4^+ + ATP + NADPH, H^+ \rightarrow Gln + NADP^+}$$

Le bilan de matière obtenu est le suivant.

$$\mathbf{2{,}5Glc + 4\ ATP + NH_4^+ + NADPH, H^+ \rightarrow 4\ NADH, H^+ + AH + CO_2}$$

Les besoins en NADPH,H^+ sont assurés via la voie des pentoses phosphate selon le bilan suivant :

$$\mathbf{Glc \rightarrow 12\ NADPH, H^+ + 6\ CO_2}$$

1/12ème de glucose est donc nécessaire à la synthèse d'AH.

Avant de s'intéresser aux besoins énergétiques de la cellule, il apparaît que le potentiel rédox de la cellule doit rester équilibré après formation de 4 molécules de NADH, H^+. Différents systèmes de régulation peuvent intervenir. La NADH oxydase n'est que peu susceptible d'intervenir dans un système peu aéré tel que la fiole d'Erlenmeyer. La voie de la pyruvate formate lyase (PFL) semble la plus à même de remplir cette tâche.

$$\mathbf{Glc + 2\ NADH, H^+ \rightarrow Ethanol + Formate + 2\ NAD^+ + 2\ ATP}$$

Il apparaît ainsi, que le catabolisme de 2 molécules de glucose soit nécessaire au rééquilibrage du potentiel d'oxydo-réduction. Cet apport en glucose si l'on considère l'équation ci-dessus va de même assurer les apports énergétiques nécessaires à la synthèse de l'AH (4 molécules d'ATP).

En conclusion la synthèse d'AH devrait nécessiter un large excès en glucose à savoir : 2,5 + 0,083 + 2 molécules de glucose soit **4,583 molécules de glucose** pour **une molécule d'AH.**

Les précédents résultats ne vont pas forcément dans ce sens. Deux hypothèses peuvent ainsi être explorées. Tout d'abord l'étude de l'effet concentration en glucose, mais cette fois, en complément de facteurs connus comme associés à son catabolisme et à la synthèse d'AH (présente étude). Et autrement, un effet souche, limitant quant au catabolisme du glucose et donc à la synthèse d'AH (étude développée en parallèle et décrite dans le Chapitre II de la partie « Résultats »).

De ce point de vue, la « concentration initiale en glucose » fournie est un facteur qui doit être pris en considération. Considérant la glutamine en tant que co-substrat, le facteur « concentration en glutamine » pourra être considéré à titre de précurseur de la synthèse d'AH (facteur déjà à l'étude mais au cours d'expériences au « un facteur à la fois » sans maîtrise des concentrations ou de l'effet « glucose » associé). De plus, il apparaît que la production d'AH entre en compétition, pour le glucose, avec la production de biomasse, d'acétate et de lactate (Blank et al., 2005). Un essai de shunt de la glycolyse par ajout en excès de pyruvate dans le milieu de culture sera, par conséquent, étudié.

Le plan défini sous MODDE9 est un plan composite à faces centrées à 3 facteurs et 3 niveaux (Tableau 12). Quatre réponses seront étudiées par analyse de surface (RSM) : la production finale de biomasse, la production maximale d'AH ainsi que les concentrations maximales atteintes en lactate et en acétate. La résolution du plan d'expériences se fera selon un modèle de type quadratique. Les conditions de mise en œuvre en fioles d'Erlenmeyer restent identiques à celles des essais précédents (souche TDF1, volume réactionnel de 100 mL, température de 37 °C, agitation à 160 tr/mn, pH non régulé, base milieu PKN).

Tableau 12. Structure du plan d'expériences pour l'optimisation de la composition du milieu de culture en fioles d'Erlenmeyer pour la production d'AH chez Streptococcus zooepidemicus.

Facteurs	Niveaux		
	-1	**0**	**1**
Glucose (g/L)	5	15	25
Pyruvate (g/L)	0	5	10
Glutamine (g/L)	0	2,5	5

Les coefficients de détermination (R^2) obtenus pour les réponses [AH], [X] et [Lactate] et [Acétate] sont respectivement de 0,91 ; 0,70 ; 0,97 et 0,98 (Figure 12). Ces résultats sont largement acceptables pour les réponses « production de biomasse », « production de lactate » et « production d'acétate » et montrent que la modélisation quadratique explique à hauteur de 90 % et plus les valeurs obtenues. La complexité du mécanisme de biosynthèse de l'AH explique des valeurs de R^2 plus discutables pour la réponse « production d'AH ». Une nouvelle fois, il est plus que probable qu'un ou plusieurs facteurs autres que les variables étudiées jouent un rôle clé dans son métabolisme de production.

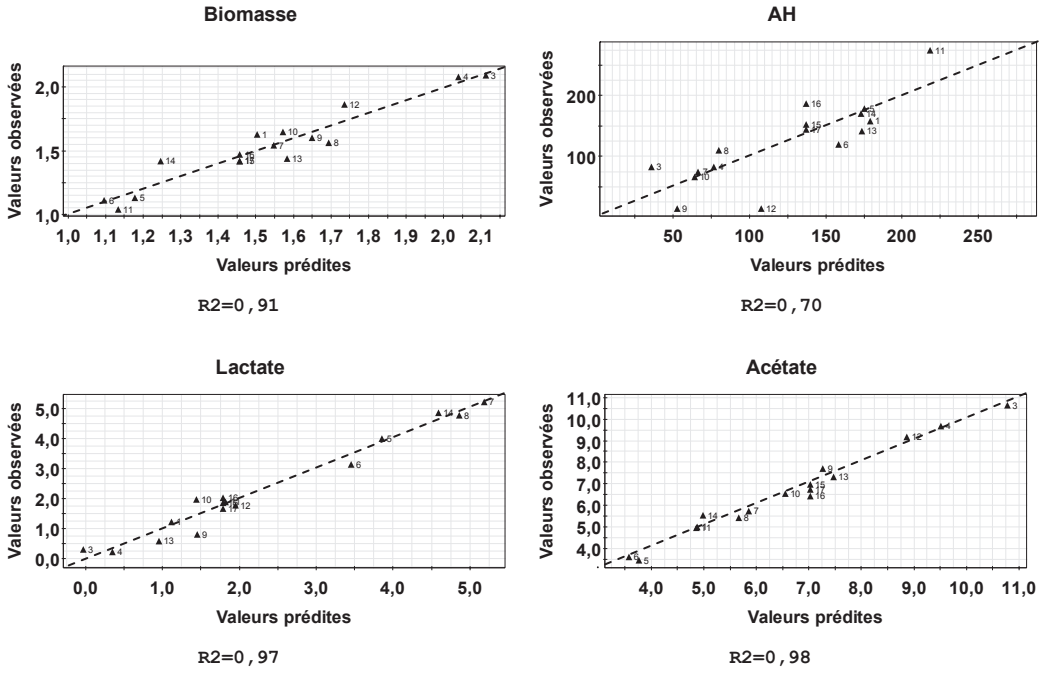


Figure 12. Expression des valeurs observées en fonction des valeurs prédites par le modèle, et R^2 associés.

Une production maximale d'AH améliorée de 80 % en comparaison au témoin PKN non modifié de cet essai est obtenue pour des concentrations en glucose de 5 et 15 g/L, en pyruvate de 0 g/L et en glutamine de 2,5 g/L. Les résultats de la Figure 13 permettent de décrire l'influence croisée des trois facteurs étudiés sur les réponses production de biomasse et d'AH.

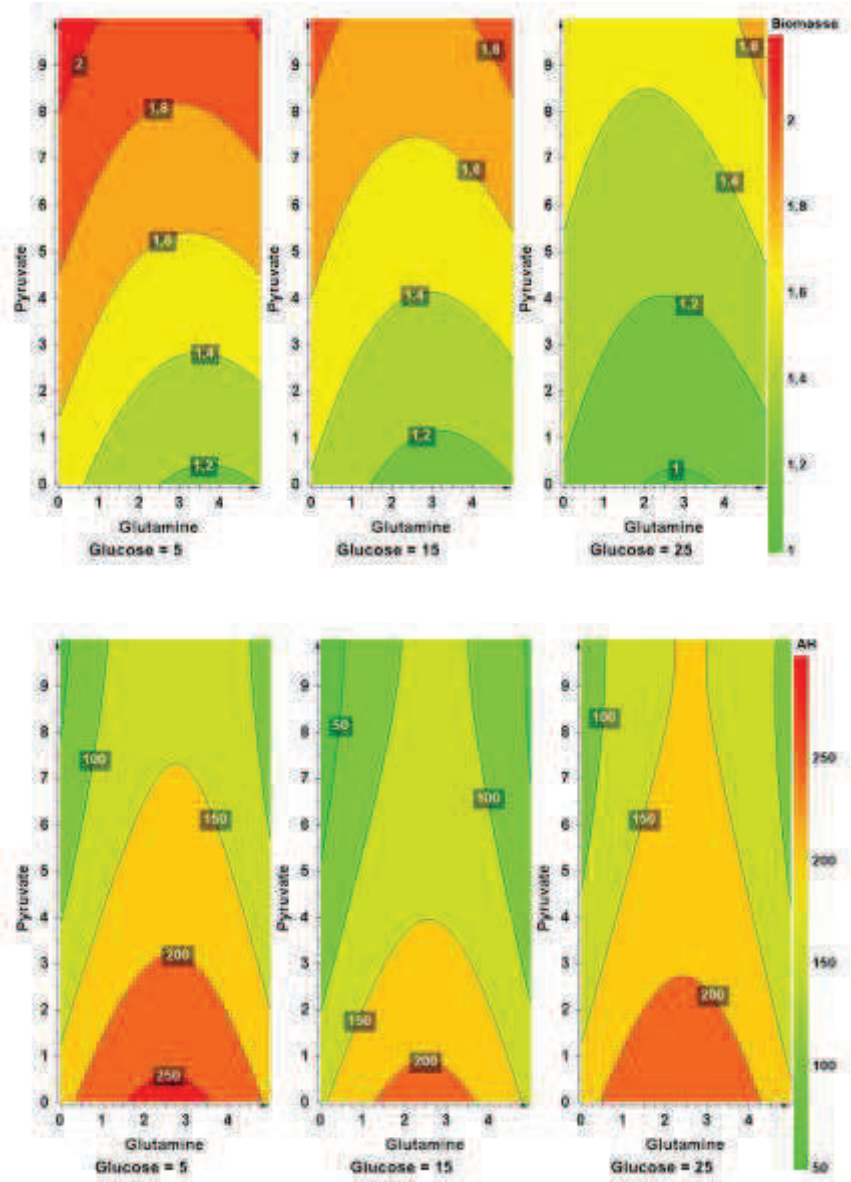


Figure 13. Surfaces de réponses obtenues (En haut : production de biomasse (g/L). En bas : production d'AH (mg/L)) suite à la résolution du plan d'expériences à trois facteurs et trois niveaux.

La production de biomasse est favorisée pour des concentrations élevées en pyruvate et faibles en glucose et en glutamine (Figure 13). La production d'AH (Figure 13) est, elle, favorisée dans des conditions différentes : concentrations nulles en pyruvate, intermédiaires en glutamine (2,5 g/L) et faibles en glucose (5 g/L).

Document confidentiel

Une nouvelle fois, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure sur la nécessité d'un excès en glucose dans le cadre de la synthèse d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus* (fioles d'Erlenmeyer). Ces résultats sont probablement souche dépendants ou résultent peut-être du mode de mise en œuvre.

De plus, la compétition entre production de biomasse et production d'AH est ici soulignée. Si l'on considère les réponses production de lactate et d'acétate (Figure 14), nous pouvons constater que les tendances observées confirment les résultats obtenus quant à la production d'AH.

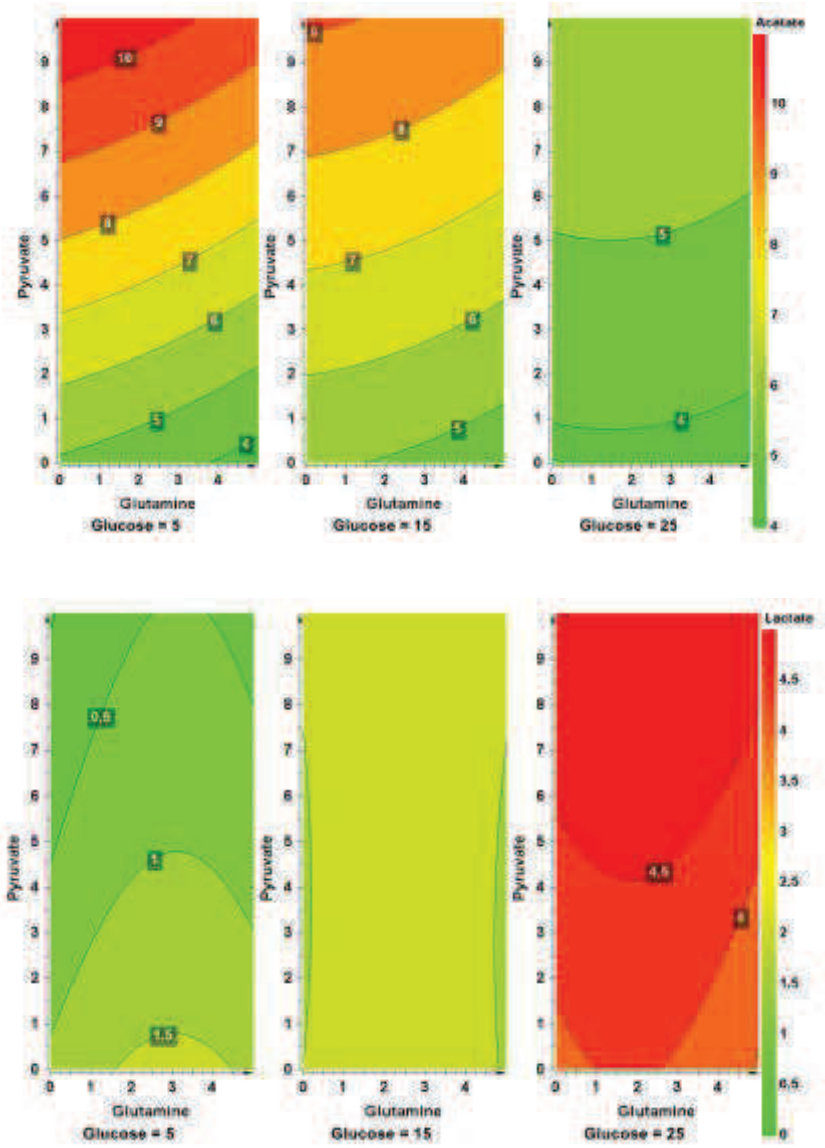


Figure 14. Surfaces des réponses obtenues (En haut : production d'acétate (g/L). En bas : production de lactate (g/L)) suite à la résolution du plan d'expériences à trois facteurs et trois niveaux.

En effet, l'ajout de pyruvate dans le milieu de culture (à faibles concentrations en glucose et en glutamine) va significativement augmenter la production d'acétate (jusqu'à 10 g/L avec 5 g/L de glucose à l'état initial). Les flux métaboliques dérivant du pyruvate ajouté et, par conséquent, l'acétyl-CoA généré par le catabolisme du glucose sont donc redirigés vers la production d'acétate compliquant ainsi son intégration dans la voie de synthèse de l'AH. Un shunt de la glycolyse n'est donc pas possible dans ces conditions.

D'autre part, dans des conditions où les concentrations initiales en glucose et en pyruvate sont élevées, de faibles productions d'AH sont mises en évidence en corrélation avec de hauts niveaux de production en lactate. En effet, plus la concentration en lactate produit est élevée (fonction de l'ajout en pyruvate à hautes concentrations en glucose), plus le flux de matière dirigé vers la production d'AH est réduit, indiquant ainsi une compétition nette entre ces deux réponses. Le facteur concentration initiale en glucose joue donc bien un rôle clé dans la cascade métabolique liée à la production d'acide hyaluronique.

Un réajustement de la formulation du milieu de culture a donc été entrepris (Tableau 13).

Tableau 13. Composition du milieu de culture PKN suite aux résultats du plan d'expériences.

Milieu PKN v.3 –	
Composition en g/L d'eau ultra-pure	
D(+)- glucose	5
Peptone de soja E110	13,8
Extraits de levure 444	30
Glutamine	2,5
$MnSO_4$	0,01
$MgSO_4$	1
K_2HPO_4	0,2
KH_2PO_4	1
$CaCl_2$	0,01
$NaC_2H_3O_2$	4,5
$NaHCO_3$	2,5
NaH_2PO_4, H_2O	3,19
Na_2HPO_4	7,35

Document confidentiel

4. Conclusion

L'accumulation d'informations robustes quant au métabolisme de synthèse de l'AH et la formulation d'un milieu de culture convenant aux exigences de croissance de *Streptococcus zooepidemicus* sont mis en avant dans ce troisième chapitre. Néanmoins, ces études ciblées sur la formulation d'un milieu de culture n'auront pas permis d'atteindre des concentrations finales en AH libre supérieures à 0,5 g/L. Par ailleurs cette étude a permis de mettre en avant l'influence de facteurs clés tels que l'oxygénation et le mode de mise en œuvre. L'influence de la concentration initiale en glucose reste de même une problématique soulevée.

Afin de traiter ces aspects essentiels dans des conditions plus appropriées (réduction du nombre de facteurs limitants) le choix a été fait d'effectuer la suite de nos recherches sur la base d'un nouveau modèle biologique dont les performances de production nous ont été confirmées (mutant surproducteur obtenu par mutagénèse aléatoire à la NTG). Le développement de souches surproductrices a été poursuivi sur nos souches environnementales de manière simultanée avec la poursuite de cette étude.

Chapitre IV

Mise en œuvre d'un procédé de production d'AH
Conditions de culture et mode de mise en œuvre

Document confidentiel

SOMMAIRE - RESULTATS CHAPITRE IV

1. INTRODUCTION 153

2. CHANGEMENT DE MODELE BIOLOGIQUE POUR UNE PRODUCTION D'AH AMELIOREE 153

3. VALIDATION EXPERIMENTALE : MODELE MICROBIOLOGIQUE / MILIEU DE CULTURE 155

4. MISE EN ŒUVRE EN BIOREACTEUR DE 3 L EN MODE DISCONTINU A PH ET SATURATION EN OXYGENE REGULES 157

5. INFLUENCE DES CONDITIONS D'APPORT EN GLUCOSE 165

5.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE EN GLUCOSE 165
5.2. INFLUENCE DU MODE D'ALIMENTATION 169

6. ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'AERATION SUR LA PRODUCTION D'ACIDE HYALURONIQUE PAR *STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS* 174

7. ETUDE DE L'INFLUENCE CROISEE DES FACTEURS OXYGENATION ET VITESSE D'AGITATION SUR LA PRODUCTION D'AH 179

8. CONCLUSION 189

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Aspects macroscopiques et microscopiques de la souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus. 154

Figure 2. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 (Bioréacteur 3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu PKN). 158

Figure 3. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 (Bioréacteur 3 L , pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu LAI). 158

Figure 4. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 avec conditions de pré-culture modifiée (Bioréacteur 3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu PKN). 162

Figure 5. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 avec conditions de pré-culture modifiée (Bioréacteur 3 L , pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu LAI). 162

Figure 6. Evolution de X, AH produit et vitesse spécifique de production d'AH en fonction du temps sur milieux LAI et PKN. 163

Figure 7. Production d'AH en fonction de la concentration résiduelle en glucose sur des cultures bactériennes en milieu PKN et milieu LAI (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus). 164

Figure 8. Evolution de la concentration en AH en fonction de la concentration en glucose (CIG 70 g/L) sur des cultures bactériennes en milieu PKN et milieu LAI (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus). 168

Figure 9. Evolution de la production de biomasse, d'AH et de la consommation de glucose au cours de cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %) - Souche ATCC 39920 – milieu PKN – Alimentations échelonnées (au total, 100 g/L ont été disponibles pour les bactéries). 170

Figure 10. Evolution de la pO_2 et de la production d'AH, de biomasse et des produits du métabolisme central au cours de cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %) - Souche ATCC 39920 – milieu PKN – Alimentations échelonnées (au total, 100 g/L ont été disponibles pour les bactéries). 170

Figure 11. Production d'AH en fonction de la concentration résiduelle en glucose (3 alimentations échelonnées) sur des cultures bactériennes en milieu PKN et milieu LAI (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus). 172

Figure 12. Photographies des mobiles d'agitation mis en œuvre. A gauche : pales inclinées. Au centre : « oreilles d'éléphant ». A droite : disposition sur l'axe central. 175

Figure 13. Effet de la nature du mobile d'agitation (pales inclinées ou pales Rushton) ainsi que de l'oxygénation (augmentation de la limite basse à 50 %) sur des cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé) - Souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus– milieu LAI. 177

Figure 14. Définition des coefficients de détermination pour les réponses étudiées (taille moléculaire et concentration en AH). Expression des valeurs observées en fonction des valeurs prédites par le modèle quadratique. 181

Figure 15. Expression des surfaces de réponse obtenues au cours de l'étude de l'effet croisé des facteurs «vitesse d'agitation» et «seuil limite bas de régulation de la pression partielle en oxygène dissous». Les réponses exprimées sont la taille moléculaire (à gauche) et la concentration en AH (à droite). 183

Figure 16. Cinétiques comparées de la « croissance » cellulaire, de la production d'AH, de la pO_2 et du potentiel d'oxydo-réduction au cours de cultures de Streptococcus zooepidemicus mises en œuvre en bioréacteur de 3 L. Comparaison des essais (400 tr/mn ; 50 % OD) (B et D) et (200 tr/mn ; 25 % OD) (A et C) du plan d'expériences défini. 185

Figure 17. Représentation graphique de la viscosité dynamique en fonction du taux de cisaillement moyen appliqué. A gauche : condition (200 tr/mn ; 25 % OD) du plan d'expériences concernant l'étude de l'influence de la pO_2 et de la vitesse d'agitation sur la production d'AH. A droite : condition (400 tr/mn ; 50 % OD). 187

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste comparative des caractéristiques morphologiques et physiologiques de base des souches ATCC 6580 et ATCC 39920. 154

Tableau 2. Caractéristiques des courbes de calibrations, et écarts-type correspondants, pour la souche ATCC 39920 en comparaison aux autres souches disponibles au laboratoire. 155

Tableau 3. Résultats comparés, concernant la production de biomasse et d'AH, suite au crible de différents milieux de culture issus de la littérature (souche ATCC 39920). 156

Tableau 4. Amélioration et standardisation de la méthode de pré-culture. Résumé des principales modifications opérées. 160

Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus par application du système de culture nouvellement standardisé et comparaison sur la base du milieu PKN de l'influence de la concentration initiale en glucose. 161

Tableau 6. Synthèse des résultats obtenus lors des essais d'augmentation de la CIG sur des cultures en bioréacteur (3 L) de la souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus avec les milieux LAI et PKN. 166

Tableau 7. Récapitulatif et comparaison des données issues des cultures réalisées en bioréacteur dans le cadre de l'étude de l'influence de la CIG et du mode d'alimentation sur la production d'AH microbien (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus) 171

Tableau 8. Récapitulatif des résultats obtenus suite aux essais d'amélioration des conditions hydrodynamiques sur des cultures en bioréacteur de la souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus. 176

Tableau 9. Synthèse des résultats obtenus pour le plan d'expériences étudiant l'influence croisée des facteurs « seuil limite bas en pO_2 » et « vitesses d'agitation ». 182

Tableau 10. Résultats obtenus au cours de l'optimisation multicritère lors de l'étude de l'effet croisé des facteurs «vitesse d'agitation» et «seuil limite bas de régulation de la pression partielle en oxygène dissous» sur les réponses de taille moléculaire et de concentration de l'AH produit par voie microbienne. 184

Tableau 11. Résumés des données rhéologiques et hydrodynamiques obtenus à l'aide de la méthode théorique de calcul des coefficients de transfert d'oxygène pour un fluide défini comme non-newtonien. 188

CHAPITRE IV : MISE EN ŒUVRE D'UN PROCEDE DE PRODUCTION D'AH – CONDITIONS DE CULTURE ET MODE DE MISE EN OEUVRE

1. Introduction

A l'issue de l'étape de formulation d'un milieu de culture pour une exploitation à plus grande échelle, différentes informations relatives aux conditions de mise en œuvre ont pu être observées et retenues. Les productions d'AH ont néanmoins été considérées comme trop faibles pour pouvoir interpréter correctement ces données. Les études relatives à l'amélioration des conditions de culture à appliquer pour la mise en œuvre de *Streptococcus zooepidemicus* ont par conséquent été effectuées en utilisant une autre souche ATCC de référence présentant des capacités initiales de production d'AH plus exploitables que nos souches « environnementales ».

Une première étape de ce chapitre a pour objectif d'évaluer les performances de production d'AH proposées par ce nouveau modèle biologique, incluant une phase de validation du milieu de culture précédemment formulé. La mise en place d'une « banque de données » de référence sera ainsi effectuée.

Par la suite, les travaux de ce chapitre reposeront sur le développement du procédé de production d'AH à l'échelle du bioréacteur de laboratoire en ciblant des variables physico-chimiques clés pour une amélioration de la production d'AH et une meilleure compréhension des voies de synthèse impliquées. Nous chercherons à étudier, dans un premier temps, l'influence du mode de culture. Notre regard sera plus particulièrement porté sur la standardisation du mode de pré-culture. Le mode d'alimentation, concernant plus spécifiquement le substrat de base du catabolisme (source énergétique et éventuellement carbonée), sera de même exploré. Dans un second temps, nous aborderons des aspects moins renseignés, liés à l'aération et aux contraintes hydrodynamiques, qui représentent, si l'on se réfère à la littérature, des points critiques tant en termes de niveau de connaissance qu'en impact sur le métabolisme de production de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*.

2. Changement de modèle biologique pour une production d'AH améliorée

L'hypothèse a été formulée que les données cumulées, à ce stade de l'étude, permettent d'avoir une vision générale fiable des différents facteurs abiotiques ayant un impact sur la

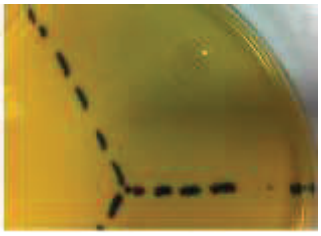
production d'AH. Les derniers essais réalisés n'ont néanmoins pas abouti à des niveaux de production suffisamment élevés pour pouvoir interpréter les résultats découlant des différents essais. Les propriétés métaboliques des souches à disposition non encore modifiées génétiquement constituent, à ce stade de l'étude, un facteur limitant. Une souche ATCC supplémentaire (39920) considérée comme productrice d'AH de grandes tailles moléculaires a en conséquence été achetée auprès de l'American Type Culture Collection. Sa mise en œuvre sera faite uniquement à titre de modèle d'étude, son utilisation industrielle étant soumise à des restrictions financières et techniques (droits pas nécessairement renouvelables d'une année sur l'autre). Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques sont listées dans le Tableau 1 et la Figure 1 en comparaison avec celles de la souche ATCC initialement acquise (6580).

Tableau 1. Liste comparative des caractéristiques morphologiques et physiologiques de base des souches ATCC 6580 et ATCC 39920.

Souche	Origine	Données macroscopiques		Données microscopiques	Activité Hémolytique
		En milieu liquide	Sur milieu solide		
39920	ATCC	Culture homogène	Colonies translucides	Longues chaînes de coques	NON
6580	ATCC	Culture homogène	Colonies crème	Longues chaînes et amas de coques	OUI



Souche ATCC6580 avec halo d'activité hémolytique (à gauche) ; 39920 sans halo d'activité hémolytique (à droite).



Aspect ATCC 39920 sur boîte de Pétri (gélose BHI-B).



Observation microscopique, ATCC39920 (x40).

Figure 1. Aspects macroscopiques et microscopiques de la souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus.

Les caractéristiques listées dénotent des différences fondamentales entre les deux souches de « référence ». La perte de l'activité hémolytique chez la souche ATCC 39920 est un

indicateur de bonne mise en œuvre d'une étape de mutagénèse aléatoire (spécificité annoncée par le fournisseur). De plus, l'aspect translucide atypique des colonies semble révéler une activité de synthèse d'AH (partie « Résultats » - chapitre II).

L'objectif de la présente étude consiste en une calibration expérimentale à partir d'un nouveau modèle biologique. Dans l'optique d'effectuer des suivis cinétiques complets à partir de cette souche, la méthode de quantification de la biomasse par spectrophotométrie a été développée pour cette nouvelle souche dans les conditions décrites dans le Chapitre I de la partie « Résultats ». Les résultats moyennés aboutissent à un R^2 supérieur à 95 %. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2 (ci-dessous) et sont comparés à ceux des autres souches disponibles.

Tableau 2. Caractéristiques des courbes de calibration, et écarts-type correspondants, pour la souche ATCC 39920 en comparaison aux autres souches disponibles au laboratoire.

Souche	Pente (UDO/cell.mL^{-1})	Ordonnée à l'origine	Ecart-type (%)	Gamme de linéarité (abs)
ATCC 39220	$4{,}1.10^{-9}$	$3{,}80.10^{-3}$	5	0,87
ATCC 6580	$4{,}5.10^{-9}$	$6{,}85.10^{-3}$	4,4	1,30
11248/11053	$3{,}2.10^{-9}$	$1{,}09.10^{-2}$	2,9	0,84
10062	$2{,}3.10^{-9}$	$3{,}54.10^{-2}$	4,2	0,88
TDF1	$2{,}4.10^{-9}$	$1{,}13.10^{-2}$	3,3	1,10

3. Validation expérimentale : modèle microbiologique / milieu de culture

L'objectif de cette étude est de comparer les performances de base du milieu PKN formulé avec les données de la littérature. A ce titre, la nouvelle souche modèle ATCC 39920 servira de base d'étude.

Afin d'effectuer une évaluation des performances de la souche ATCC 39920 ainsi que du milieu PKN modifié, différents milieux de culture issus de la littérature (études ayant pour modèle la souche concernée) ont été criblés en comparaison au milieu de culture PKN

formulé au laboratoire (partie « Résultats » - Chapitre III). Pour cela, des cultures à l'échelle de la fiole d'Erlenmeyer ont été mises en place selon le protocole habituel. Les données obtenues sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3. Résultats comparés, concernant la production de biomasse et d'AH, suite au crible de différents milieux de culture issus de la littérature (souche ATCC 39920).

	Chen et al., 2009	Don et al., 2010	Huang et al.,2006	**Lai et al., 2011**	Lai et al., 2012	BHI (glc 2 g/L)	BHI (glc 20 g/L)	**PKN**
X (g/L)	0,17	0,10	0,18	**0,18**	0,16	0,10	0,15	**0,45**
AH (g/L)	0,18	0,10	0,20	**0,18**	0,17	0,02	0,05	**0,34**
« Rendement » AH/X (g/g)	1,08	1,02	1,14	**0,99**	1,03	0,21	0,32	**0,76**

Les résultats concernant le « rendement » de production d'AH par g de biomasse expriment des tendances éloignées de celles observées jusqu'ici à partir des souches « environnementales » et de la souche ATCC 6580. En effet, la quantité d'AH produit par g de biomasse est ici, globalement, de l'ordre du gramme et non du dixième de gramme. De plus, les résultats permettent de valider le milieu PKN comme un substrat d'intérêt pour la production d'AH à partir de souches de *Streptococcus zooepidemicus* (0,45 g/L d'AH produit pour un « rendement » de 0,76 g d'AH par g de biomasse). Toutefois, cette validation se fait sans présager de modifications dynamiques éventuelles en culture discontinue-alimentée par exemple, et sans prendre en considération les problématiques de rédox et d'O_2. Nous conserverons, de plus, la base de milieu LAI (Lai et al., 2011) comme milieu de référence pour des études comparatives en bioréacteur chez la souche ATCC 39920. Ce choix est basé sur des critères de production d'AH (0,18 g/L pour un « rendement » proche de 1 g d'AH par g de biomasse) mais aussi de composition du milieu. En effet, d'autres milieux expérimentés présentent des résultats comparables voire légèrement supérieurs. Cependant, la présence de NaCl dans leur composition peut s'avérer problématique pour le dosage au CTAB en raison d'interférences notables (Oueslati et al., 2014). La composition du milieu « LAI » est détaillée dans la partie II « Matériel et Méthodes » et présente l'intérêt d'inclure une concentration initiale en glucose de 50 g/L. Cette importante différence en comparaison de la composition du milieu PKN (5 g/L de glucose) conduira à une étude plus particulière de l'effet de la concentration initiale en glucose sur la base de systèmes instrumentés à l'échelle

du laboratoire (bioréacteur de 3 L) et à partir d'une souche potentiellement surproductrice d'AH.

Des « rendements » de production d'AH par g de biomasse plus élevés, en comparaison aux essais précédents, sont obtenus au cours de la mise en œuvre de la souche ATCC 39920 sur des cultures en fioles d'Erlenmeyer. L'adaptation de la formulation du milieu de culture PKN permet d'observer des productions d'AH plus intéressantes à partir de cette souche en comparaison aux autres milieux de culture mis en œuvre. Un second milieu est néanmoins sélectionné à titre de milieu de référence pour les études à venir (milieu LAI, 50 g/L de glucose). La souche ATCC 39920 est conservée comme modèle d'étude dans l'attente de souches environnementales génétiquement modifiées.

4. Mise en œuvre en bioréacteur de 3 L en mode discontinu à pH et saturation en oxygène régulés

Des essais en bioréacteur de 3 L ont été mis en œuvre sur la base du milieu de culture PKN formulé et du milieu LAI de référence retenu. Les objectifs sont ici multiples :

- valider la base de milieu PKN formulée,
- valider le nouveau modèle biologique (ATCC 39920) comme base d'étude,
- statuer, en complément, sur l'influence de la concentration initiale en glucose (différence notable entre le milieu PKN et le milieu LAI) dans des conditions de mise en œuvre à plus grande échelle (bioréacteur de laboratoire).

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
24 h	3 L	PKN v.3 ou LAI	37 °C	Contrôlé à 7	0,25 à 1 vvm	400 tr/mn

Souche mise en œuvre : ATCC 39920.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique.

La régulation du pH (7) est réalisée dans des conditions identiques à l'essai précédent afin de valider notre hypothèse de « souche dépendance » de la production d'AH. Afin de s'aligner avec les conditions de culture préconisées pour cette souche dans la littérature, le seuil limite bas de pO_2 est réajusté à une consigne de 10 % contre 50 % sur les essais précédents (Liu et al., 2009b). La régulation de la pO_2 est assurée dans des conditions comparables aux essais précédents. La souche ATCC 39920 est utilisée comme modèle d'étude. Les résultats sont présentés dans les Figure 2 et Figure *3*.

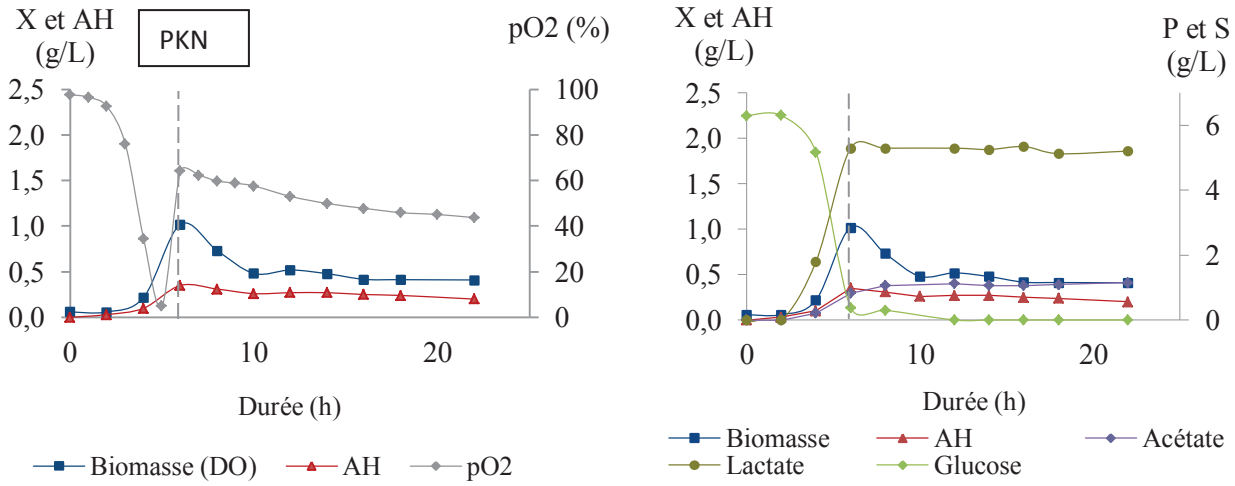


Figure 2. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 (Bioréacteur 3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu PKN).

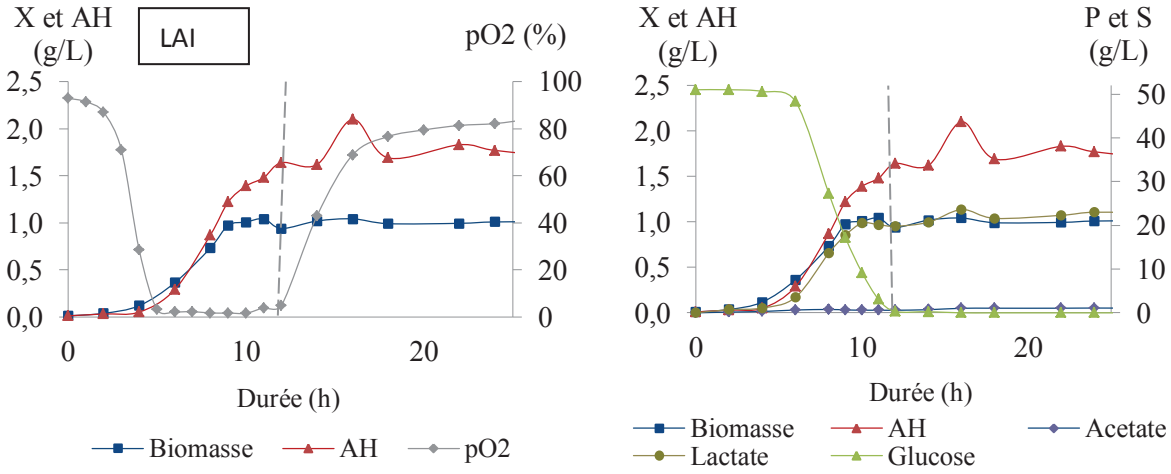


Figure 3. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 (Bioréacteur 3 L , pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu LAI).

Dans les conditions mises en œuvre, la souche 39920 produit de l'ordre de 2 g/L d'AH sur la base du milieu référence issu de la littérature (LAI, Glc_0 = 50 g/L). Les résultats obtenus à partir du milieu PKN (Glc_0 = 6 g/L au lieu de 5 g/L) donnent une concentration maximale en AH libre de 0,4 g/L. Néanmoins, il est important de noter que la production de biomasse, d'AH et des produits du métabolisme central sur milieu PKN est stoppée prématurément dès l'épuisement du glucose. Ceci se traduit par un arrêt de la consommation en oxygène, avec une remontée de la pression partielle en oxygène dissous dans le réacteur. Le glucose est donc très probablement un élément limitant dans ce milieu avec cette souche aux capacités accrues de production d'AH.

L'importance clé du facteur souche est donc ici soulevée. Une production d'AH de l'ordre de 2 g/L est possible sur la base de la souche de référence ATCC 39920 avec le milieu LAI (non limitant en glucose). La validation d'un modèle biologique d'étude nous a logiquement conduits à **normaliser la méthode de pré-culture** en considération des caractéristiques de cette nouvelle souche aux performances de production d'AH confirmées.

La production d'AH est de même possible avec le milieu PKN mais une éventuelle **limitation en glucose** sur la base d'une mise en œuvre en bioréacteur a été mise en évidence. La complexité du métabolisme de production de l'AH est donc une nouvelle fois mise en exergue puisqu'elle inclut une maîtrise croisée de facteurs tels que la souche, la formulation du milieu de culture, les conditions physicochimiques (pH, aération) et donc le procédé de mise en œuvre (différences fondamentales entre production en fioles d'Erlenmeyer et production en bioréacteur).

Standardisation de la méthode de pré-culture

Ces résultats plus que concluants, à partir de la souche ATCC 39920, nous ont conduits à normaliser la méthode de pré-culture sur la base des caractéristiques de cette souche productrice d'AH. L'objectif de cette étape était de déterminer un protocole très précis de régénération et de propagation cellulaire à partir de cultures « stock ». Un protocole initial de pré-culture intégrant à la fois nos connaissances pratiques sur la croissance de ce micro-organisme ainsi que les données de la littérature avait été défini (Tableau 4). Des

modifications ont été apportées afin de permettre (1) une meilleure régénération des cellules (culture sur gélose systématique), (2) une meilleure propagation cellulaire (contrôle des différentes étapes par des mesures systématiques de la DO).

Tableau 4. Amélioration et standardisation de la méthode de pré-culture. Résumé des principales modifications opérées.

ETAPE	Système de pré-culture initial - souches environnementales et souche ATCC 6580	Système de pré-culture optimisé et standardisé pour des souches à fort potentiel de production d'AH
REGENERATION	X	**Régénération sur gélose BHI au sang** 24 h, 37 °C
PROPAGATION	**BHI 20 g/L de glucose** 100 mL - 37 °C – 160 tr/mn→ (DO: 1)	**BHI 20 g/L de glucose** 100 mL - 37 °C – 160 tr/mn→**(DO : 0,7-1)**
ADAPTATION	**PKN/LAI 12,5g/L de glucose** 37 °C – 160 tr/mn→ 30 h	**PKN/LAI 12,5 g/L de glucose** 100 mL - 37 °C – 160 tr/mn→**(DO : 1-2)**
	PKN/LAI 12,5 g/L de glucose 37 °C – 160 tr/mn→ 17 h	**PKN/LAI 12,5 g/L de glucose** 100 mL - 37 °C – 160 tr/mn→ **(DO : 1-3)**

Validation du système de pré-culture et confirmation d'une potentielle limitation en glucose sur milieu PKN

Un essai de validation de ces conditions standardisées de pré-culture a donc été réalisé en parallèle avec du milieu PKN et du milieu LAI avec une concentration initiale en glucose de 50 g/L (donnée reprise du milieu LAI) afin d'éviter toute limitation en glucose et de pouvoir comparer les résultats obtenus avec ces deux milieux. Dans ce cas, l'essai avec le milieu LAI servira de témoin pour l'étude de l'effet « standardisation de la pré-culture ».

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
24 h	3 L	PKN v.3 modifié (50 g/L de glucose) ou LAI	37 °C	Contrôlé à 7	0,25 à 1 vvm	400 tr/mn

Souche mise en œuvre : ATCC 39920.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique. **Détermination de la taille moléculaire**.

Les résultats synthétisés dans le Tableau 5 montrent qu'une production d'AH de l'ordre de 3 g/L est observée avec les deux milieux de culture. Ceci représente une amélioration de 50 % sur la base du milieu LAI mettant en évidence l'importance de la normalisation du système de pré-culture ainsi que la nécessité d'y inclure une étape systématique de régénération des cellules. Les productions d'AH à partir des milieux PKN (v.3) et PKN (v.3) supplémenté en glucose (50 g/L) sont radicalement différentes confirmant ainsi le phénomène de limitation en glucose supposé.

Tableau 5. Synthèse des résultats obtenus par application du système de culture nouvellement standardisé et comparaison sur la base du milieu PKN de l'influence de la concentration initiale en glucose.

Milieu	[Glucose] initiale (g/L)	$[AH]_{max}$ (g/L)	Taille moléculaire (MDa)	$[X]_{max}$ (g/L)	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)	Durée de culture (h) à $[AH]_{max}$	πAH_{max}(g/g.h)
LAI Témoin	50	2,0	ND	1,00	2,0	12	0,53
PKN Témoin	5	0,3(5)	ND	0,73	0,5	6	0,25
LAI	50	3,2	2,4	1,10	2,9	12	1,37
PKN	50	3,1	1,9	1,50	2,1	9	0,99

Des tailles moyennes de 1,9 MDa et 2,4 MDa pour le milieu PKN et le milieu LAI respectivement ont pu être mesurées par chromatographie d'exclusion stérique et détection de la diffusion de la lumière aux faibles angles. Les « rendements » de production d'AH en fonction de la biomasse générée sont plus élevés avec le milieu LAI (2,9 g AH/g de X) qu'avec le milieu PKN (2,1 g AH/g de X). Ces valeurs sont, de plus, supérieures d'un facteur compris entre 6 et 9 par rapport aux essais avec les souches environnementales (0,33 g AH/ g X au maximum). Cette bascule métabolique traduit bien un phénomène de compétition entre production d'AH et production de biomasse. Les cinétiques d'évolution des différents paramètres considérés sont détaillées dans les Figure 4 et Figure 5.

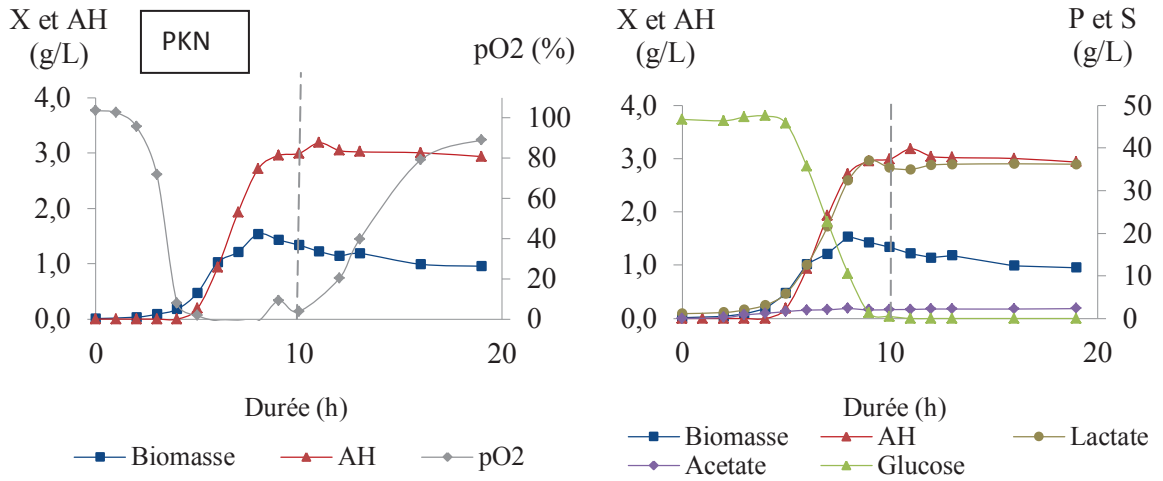


Figure 4. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 avec conditions de pré-culture modifiées (Bioréacteur 3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu PKN).

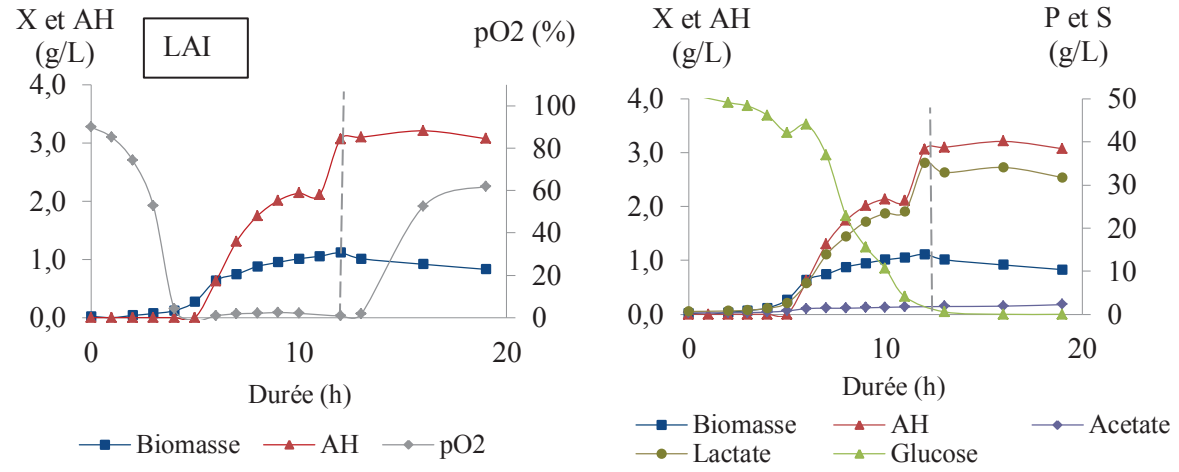


Figure 5. Cinétique de culture en mode discontinu de la souche ATCC 39920 avec conditions de pré-culture modifiées (Bioréacteur 3 L , pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %, milieu LAI).

Dans les deux cas nous pouvons observer une simultanéité entre la phase de production d'AH et la forte limitation en oxygène. Cette limitation en oxygène pourrait s'avérer nécessaire à la production d'AH ou n'être qu'une résultante de cette production. L'effet de l'oxygène (et du potentiel d'oxydo-réduction) sur la production d'AH doit être exploré plus en profondeur. Les cinétiques de croissance et de production des différents métabolites montrent des profils quasiment identiques sur la base des deux milieux de culture. Malgré tout, la concentration maximale en AH est atteinte plus rapidement avec le milieu PKN qu'avec le milieu LAI (9 h et 12 h respectivement). Du point de vue d'un procédé de production à plus grande échelle, cette différence doit être considérée. Les taux de recouvrements carbonés sont de 95 % (milieu PKN) et 85 % (milieu LAI) avec environ 80 % de ce flux carboné dirigé vers la production de lactate, 7 % vers la production d'AH, 7 % vers la production d'acétate et enfin

6 % vers la production de biomasse. Cette répartition globale des flux carbonés est en adéquation avec les données de la littérature (Shah et al., 2013).

Ces résultats montrent que :

- la souche ATCC 39920 possède un réel potentiel de production d'AH et permet de définir un profil type recherché pour les essais de sélection de souches performantes à partir de nos souches environnementales (Chapitre II et Chapitre V de synthèse de la partie « Résultats »),
- le système de pré-culture défini permet d'atteindre, chez la souche ATCC 39920 de *Streptococcus zooepidemicus*, un état physiologique permettant la production d'AH (témoin sur milieu LAI),
- le milieu PKN formulé est adapté pour la production d'AH dans des conditions ou le glucose n'est pas un substrat limitant (50 g/L).

Les vitesses spécifiques de production d'AH sont proches pour les deux milieux de culture (Figure 6). Le milieu LAI permet néanmoins d'observer un phénomène de production de l'AH en deux temps qui pourrait être corrélé à un remise en suspension d'un surplus d'AH capsulaire dans un temps avancé de la culture bactérienne.

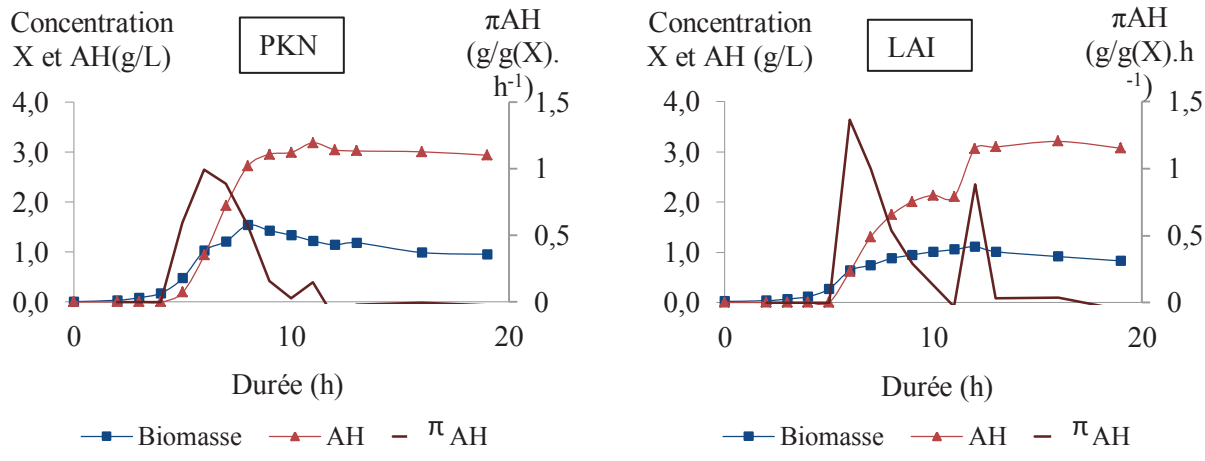


Figure 6. Evolution de la biomasse, de l'AH produit et de la vitesse spécifique de production d'AH en fonction du temps sur milieux LAI et PKN.

En complément, la courbe (Figure 7) présente l'évolution de la concentration en AH dosée dans le milieu de culture en fonction de la concentration résiduelle en glucose. Pour le milieu LAI, à partir de concentrations en glucose résiduel de 15 g/L, il y a une nette diminution de la

métabolisation de ce dernier avec une nette inflexion de la courbe (limitation en un élément autre que le glucose ?). En revanche, pour le milieu PKN, le profil de consommation conduit à penser que le glucose devient limitant juste avant d'être épuisé (pente et donc « rendements » constants avec une légère inflexion à concentrations en glucose résiduel proche de 0). Des concentrations initiales en glucose plus élevées pourraient permettre de produire plus d'AH sur un milieu « riche » tel que le milieu PKN. Les études sur le potentiel de ce milieu de culture formulé au laboratoire doivent donc être approfondies.

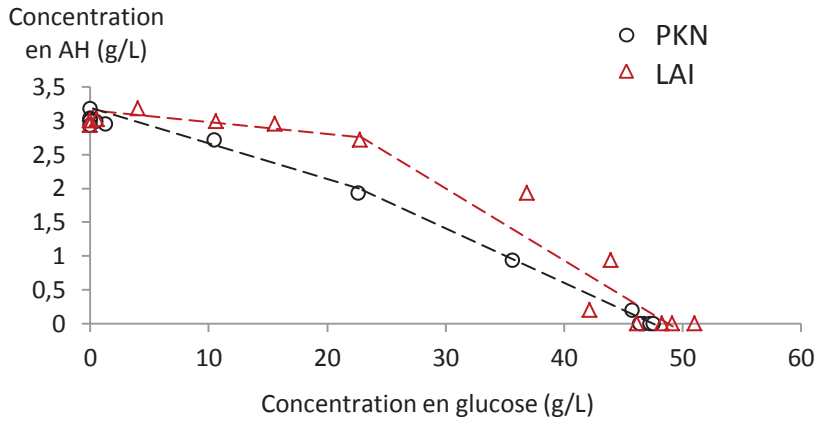


Figure 7. Production d'AH en fonction de la concentration résiduelle en glucose sur des cultures bactériennes en milieu PKN et milieu LAI (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus).

Le nouveau modèle biologique utilisé permet d'observer une bonne extrapolation du procédé de production jusque-là développé, avec une base de production d'AH de 3 g/L pour des tailles moléculaires de 2 MDa, en moyenne.

Une bonne mise en œuvre de la formulation du milieu de culture ainsi que son « extrapolabilité » peuvent ainsi être soulignées. De plus, ces résultats dénotent d'une bonne maîtrise du procédé de production d'AH, de la mise en œuvre des pré-cultures à la production en bioréacteur. En effet, ces résultats sont supérieurs aux données de la littérature relatives à la même souche de *Streptococcus zooepidemicus* (Lai et al., 2011).

Des informations complémentaires ont de plus été fournies. Un profil type, basé sur des caractéristiques propres à une souche productrice d'AH (aspect phénotypique, production majoritaire d'acide lactique, production d'AH/ g de biomasse supérieure à 1), a pu être dressé

dans le cadre de l'obtention de mutants surproducteurs à partir de souches « environnementales » aux performances non optimisées (partie « Résultats » - Chapitre II).

Ces informations mettent, de plus, en avant l'influence de facteurs abiotiques, tels que l'apport en oxygène dissous dans le milieu de culture (et donc l'équilibre rédox) ou encore les concentrations et mode d'alimentation en glucose sur la production d'AH (limitation ?). Ces facteurs feront donc l'objet d'études particulières dans la suite de ce document.

5. Influence des conditions d'apport en glucose

Ces études ont pour but de définir si la production d'AH pourrait être optimisée en s'affranchissant de toute limitation en glucose. L'effet de l'apport en glucose sera exploré selon deux approches. D'une part, en étudiant l'influence de la concentration initiale en glucose (CIG) et, d'autre part, par la mise en œuvre d'une alimentation échelonnée.

5.1. Influence de la concentration initiale en glucose

Dans des conditions proches de celles classiquement mises en œuvre dans la présente étude (milieu de culture proche, mêmes souches, volume réactionnel et mode de culture, et enfin outil de culture comparable), Pires et al., (2010) ont étudié l'effet de CIG comprises entre 5 et 90 g/L. Ils ont observé une CIG optimale de 25 g/L associée à une production d'AH de 1,21 g/L. Pour Don et al., (2010), *Streptococcus zooepidemicus* peut tolérer des CIG allant jusqu'à 40 g/L. Pour ces auteurs, des concentrations supérieures sont inhibitrices de la croissance cellulaire. Ces études ont, elles aussi, été réalisées à partir de la souche ATCC 39920 dans des conditions de culture proches des nôtres. Une concentration maximale de 1,8 g/L d'AH a été atteinte.

Les phénomènes observés Figure 7, pour une CIG de 50 g/L, sur la base du milieu PKN et du milieu LAI, nous ont conduits à étudier l'effet d'une CIG supérieure. Des cinétiques de consommation du glucose en fonction de la concentration en AH produit pourront ainsi être dressées dans le but de conclure sur l'impact d'éventuelles limitations à CIG de 50 g/L.

Dans un premier temps, des essais en bioréacteurs de 3 L ont été mis en œuvre afin de voir l'effet de la modification de la CIG (de 50 à 70 g/L) dans un milieu LAI et un milieu PKN.

L'outil employé est la culture en bioréacteur pour bénéficier de suivis cinétiques satisfaisants. A l'exception de cette modification de composition des milieux de culture, ces essais (pré-cultures, mise en place des bioréacteurs) ont été réalisés dans les mêmes conditions que l'étude précédente.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
24 h	3 L	PKN v.3 ou LAI (Glc_0 = 70 g/L)	37 °C	Contrôlé à 7	0,25 à 1 vvm	400 tr/mn

Souche mise en œuvre : ATCC 39920.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique. Détermination de la taille moléculaire.

Les résultats obtenus suite à ces essais sont résumés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Synthèse des résultats obtenus lors des essais d'augmentation de la CIG sur des cultures en bioréacteur (3 L) de la souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus *avec les milieux LAI et PKN.*

Milieu	CIG (g/L)	$[AH]_{max}$ (g/L)	Taille moléculaire (MDa)	$[X]_{max}$ (g/L)	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)	Recouvrement C total (%)	Durée de culture (h) à $[AH]_{max}$	πAH_{max} (g/g.h)
LAI	50	3,2	2,4	1,1	2,9	85	12	1,37
	70	**3,4**	**2,0**	**1,4**	**2,4**	**89**	**23**	**0,96**
PKN	50	3,1	1,9	1,5	2,1	95	9	0,99
	70	**4,3**	**1,8**	**1,7**	**2,5**	**106**	**22**	**0,78**

Il apparaît tout d'abord que l'augmentation de la CIG, quel que soit le milieu de culture utilisé, permet d'observer à la fois une augmentation de la production d'AH et une amélioration de la production de biomasse. Une augmentation du « rendement » de production d'AH par g de biomasse a lieu uniquement avec le milieu PKN. A modification de CIG équivalente, l'augmentation de la concentration maximale en AH produit est plus importante pour le milieu PKN. Ainsi, une augmentation de 50 à 70 g/L en CIG permet d'améliorer la production d'AH de 13 % avec le milieu LAI (3,4 g/L) et 39 % avec le milieu

PKN (4,3 g/L). La composition du milieu de culture LAI étant moins riche que celle du milieu PKN, il semblerait qu'à une CIG de 70 g/L ce soit un élément (ou plusieurs) du milieu autre que le glucose (minéraux, substrats azotés…) qui devient limitant au cours de la culture microbienne. Cette CIG de 70 g/L dans le milieu PKN n'apparaît donc pas directement comme inhibitrice de la synthèse d'AH (au regard des concentrations maximales atteintes) chez la souche ATCC 39920 de *Streptococcus zooepidemicus,* et ce, en contradiction avec certaines études précédentes (Don et al., 2010 ; Pires et al., 2010).

Néanmoins nous pouvons constater que les vitesses spécifiques maximales de production d'AH libre sont diminuées de 1,36 à 0,96 g/g.h pour le milieu LAI et de 0,99 à 0,78 g/g.h pour le milieu PKN. Ceci se traduit par un allongement notable de la durée de la culture, de l'ordre d'une dizaine d'heures. Les recouvrements carbonés calculés sont du même ordre de grandeur à CIG 70 qu'à CIG 50. Pour le milieu PKN il dépasse légèrement les 100 % ce qui pourrait provenir de l'assimilation de carbone issu d'autres substrats que le glucose (substrats azotés organiques). L'équilibre global de répartition des flux métaboliques pour le milieu PKN est conservé par rapport à l'essai référence avec une CIG de 50 g/L.

En prenant en considération des mesures de tailles moléculaires, nous pouvons observer que l'augmentation de la CIG n'a pas d'impact significatif sur les tailles d'AH produits. En effet, nous pouvons observer une production de molécules d'AH de taille moléculaire de 2 MDa (pour 2,4 à CIG 50) et 1,8 MDa (pour 1,9 à CIG 50) pour les milieux LAI et PKN respectivement. L'hypothèse que les poids moléculaires d'AH produits soient souche dépendants pourrait être avancée. Des essais complémentaires permettront d'infirmer ou de confirmer ce postulat mais si nous nous en référons, dans un premier temps, à l'état de l'art concernant la production d'AH de hauts poids moléculaires, il semblerait y avoir un désaccord à ce propos.

En référence à l'amélioration de la production d'AH observée dans cette étude, il semblerait effectivement qu'à CIG 50 g/L un phénomène de limitation pour le substrat énergétique et carboné ait pu être impliqué dans l'arrêt de la production d'AH. Mais qu'en est-il de cette limitation à CIG 70 g/L ? Afin de répondre à cette problématique, des courbes d'association entre concentration en AH et concentration en glucose ont pu être obtenues (Figure 8).

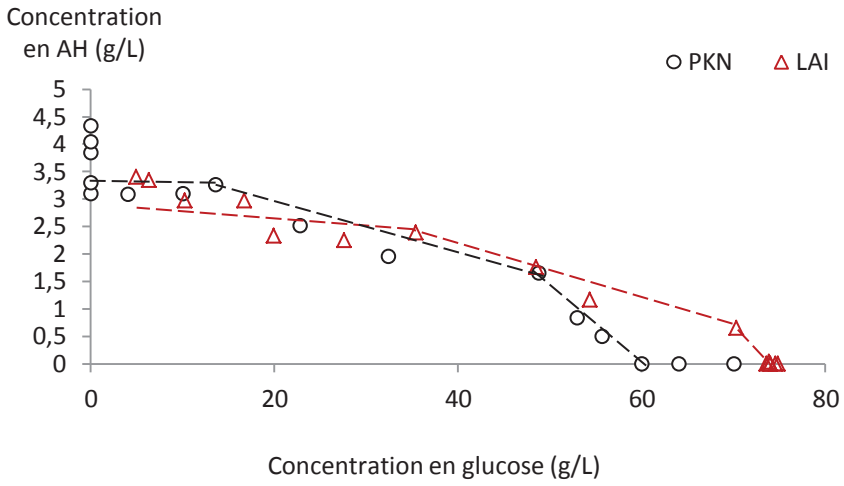


Figure 8. Evolution de la concentration en AH en fonction de la concentration résiduelle en glucose (CIG 70 g/L) sur des cultures bactériennes en milieu PKN et milieu LAI (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus).

Au vu de ces résultats, plusieurs **hypothèses** peuvent être apportées sur la base du **milieu PKN** formulé. Tout d'abord, le glucose ne semble pas être limitant à CIG de 70 g/L (nette inflexion de la courbe d'association entre concentration en glucose et concentration en AH, à environ 14 g/L de glucose résiduel). Un autre élément du milieu de culture devient alors peut être limitant. Ensuite, il apparait qu'une production d'AH, sur la base d'un substrat autre que le glucose, est observable une fois ce dernier épuisé. Enfin, nous pouvons constater, qu'une première inflexion de la pente de régression est observable à concentration résiduelle en glucose de 50 g/L environ. Cette modification de la pente (aussi constatée sur milieu LAI) pourrait, à la considération seule de ces courbes, être relative à l'influence d'un effet seuil pour ce substrat majoritaire. Une limitation d'un autre composé du milieu de culture pourrait aussi être clairement mise en cause.

D'un point de vue pratique si l'on considère l'AH produit sur la base d'une augmentation de la CIG de 50 g/L à 70 g/L, nous pouvons constater : un effet positif sur la production (substrat glucose devenu non limitant), un effet neutre sur la taille moléculaire et un effet négatif en terme de productivité. L'ajout de glucose à des concentrations initiales supérieures à 50 g/L permet donc d'améliorer la production d'AH. Ces résultats démontrent qu'une

souche de *Streptococcus zooepidemicus* peut supporter de telles concentrations en glucose a contrario de certaines études retrouvées dans la littérature.

D'un point de vue fondamental il apparaît qu'à partir d'une certaine concentration en glucose résiduel il y ait une baisse d'association entre concentration en AH et concentration en glucose. L'**hypothèse** de l'existence d'un seuil minimal de concentration en glucose résiduel à maintenir dans le milieu de culture nécessiterait d'être confirmée par des essais complémentaires. Une alimentation dynamique est envisagée.

5.2. Influence du mode d'alimentation

L'étude d'un éventuel effet seuil est difficilement appréhendable en augmentant indéfiniment la CIG. Notre choix s'est donc reporté sur une alimentation de type séquentielle en glucose. Des interprétations dynamiques seront ainsi envisageables. Dans la pratique nous nous sommes donc attachés à maintenir la concentration en glucose résiduel dans le milieu de culture au-delà d'une certaine valeur seuil par alimentations échelonnées, ceci impliquant toutefois certaines variations.

Le choix a été fait de conserver le milieu PKN comme modèle pour cette étude. En effet une meilleure association entre concentration en AH et concentration en glucose, sur la base de ce milieu, a pu être démontrée au cours d'études précédentes (Figure 7). Ces hypothèses ont été confirmées, au cours des essais précédents, par augmentation de la CIG de 50 g/L à 70 g/L (Figure 8). Des meilleurs « rendements » de production ont ainsi pu être atteints en comparaison aux essais à CIG 50 et en comparaison au milieu LAI de référence. Pour cette étude, la CIG a été réduite à 50 g/L et les essais (pré-cultures, mise en place des bioréacteurs), à l'exception de la planification d'alimentations échelonnées, ont été réalisés dans les mêmes conditions que l'étude précédente (conditions de culture décrites dans le paragraphe 5.1 du présent chapitre). En raison des différents prélèvements effectués au cours de la culture microbienne, le volume utile du bioréacteur n'est pas modifié de manière significative au cours des alimentations (solution mère de glucose concentrée à 500 g/L). Les résultats de cette étude sont présentés Figure 9, Figure 10 et Tableau 7.

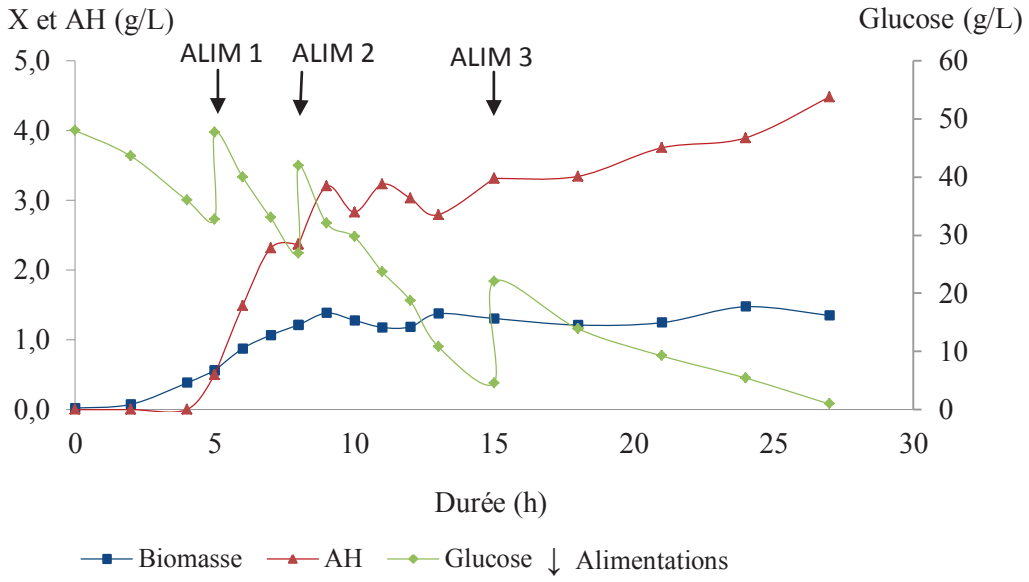


Figure 9. Evolution de la production de biomasse, d'AH et de la consommation de glucose au cours de cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %) - Souche ATCC 39920 – milieu PKN – Alimentations échelonnées (au total, 100 g/L ont été apportés pour les bactéries).

La Figure 9 permet de visualiser les temps auxquels les alimentations ont été effectuées. Le premier et le second ajout ont ainsi été réalisés lorsque la concentration en glucose résiduel atteignait des valeurs respectives de 30 et 25 g/L. La troisième et dernière alimentation a été opérée à concentration, en glucose résiduel de 5 g/L environ dans le but d'effectuer une recherche dynamique du seuil (identification d'une éventuelle « concentration minimale en glucose » à ne pas atteindre afin de conserver les performances de production chez notre souche).

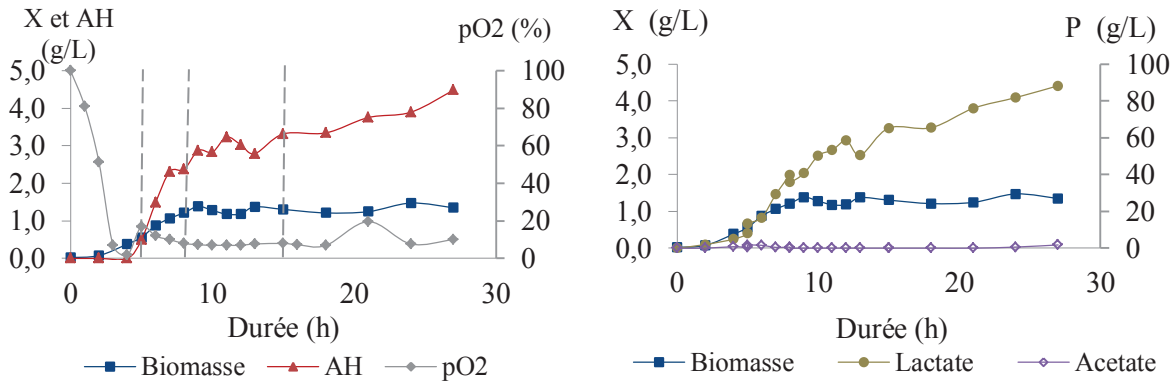


Figure 10. Evolution de la pO_2 et de la production d'AH, de biomasse et des produits du métabolisme central au cours de cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %) - Souche ATCC 39920 – milieu PKN – Alimentations échelonnées (au total, 100 g/L ont été disponibles pour les bactéries).

En premier lieu, nous pouvons constater dans la Figure 10 que la production d'AH est, une nouvelle fois, initiée lorsqu'une limitation en oxygène (apparente) est atteinte. Ceci nous conduit de nouveau à nous interroger sur le rôle de l'oxygène dans le métabolisme de synthèse de l'acide hyaluronique.

Tableau 7. Récapitulatif et comparaison des données issues des cultures réalisées en bioréacteur dans le cadre de l'étude de l'influence de la CIG et du mode d'alimentation sur la production d'AH microbien (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus*).*

Milieu	CIG (g/L)	$[AH]_{max}$ (g/L)	Taille moléculaire (MDa)	$[X]_{max}$ (g/L)	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)	$Y_{AH/Glc}$	Recouvrement C total (%)	Durée de culture à $[AH]_{max}$	πAH_{max} (g/g.h)
PKN	50	3,1	1,9	1,5	2,1	0,062	95	9	0,99
	70	4,3	1,8	1,7	2,5	0,061	106	22	0,78
	50 + alim.	**4,5**	**1,8**	**1,4**	**3,2**	**0,04**	**103**	**27**	**1,38**

Ensuite, les données du Tableau 7 permettent une comparaison rapide des différents essais réalisés avec le milieu PKN. En considérant les 100 g/L de glucose apportés au cours de la culture, la mise en œuvre de l'alimentation par ajouts échelonnés au cours de la culture bactérienne permet une augmentation de la concentration en AH produit de l'ordre de 45 % par rapport à l'essai à CIG de 50 g/L et de 5 % par rapport à l'essai à CIG de 70 g/L. De plus, une amélioration des vitesses spécifiques de production d'AH est constatée dans ces conditions (1,38 g AH /g X. h contre 0,78 sur la base de milieu PKN à CIG de 70 g/L).

En complément de cette légère augmentation de la production d'AH, la réalisation des alimentations diminue la concentration maximale atteinte en biomasse (1,4 g/L pour 1,7 g/L à CIG 70). Ceci représente un point non négligeable si l'on considère, en aval, les étapes de purification de la molécule d'AH (possibilité d'éliminer certaines étapes d'extraction lourdes et chronophages, clarification par microfiltration facilitée, réduction des contaminants). Les « rendements » de production d'AH par g de cellules bactériennes sont de plus améliorés. Une augmentation d'environ 50 % par rapport à l'essai à CIG 50 et de 28 % par rapport à l'essai à CIG 70 est constatée.

Concernant l'hypothèse d'un effet seuil (concentration en glucose) ayant un impact direct sur les performances de production d'AH par *Streptococcus zooepidemicus*, les courbes

d'association entre concentration en AH et concentration en glucose ont pu être tracées (Figure 11). Les résultats montrent qu'il pourrait exister un tel effet seuil (approximation autour de 30 g/L) puisqu'après chacune des alimentations 1 et 2, une inflexion des courbes d'association entre concentration en AH et concentration en glucose est observable. Néanmoins, ces remarques ne reposent que sur l'idée de l'abstraction faite de la production d'AH observable à partir de 15 g/L de concentration résiduelle en glucose (alimentation 3) ou si l'on considère que cette augmentation subite de la concentration en AH serait due à une remise en suspension d'AH d'origine capsulaire. La validation d'une telle hypothèse nécessiterait donc la mise en place d'études plus complètes (cultures en discontinu alimenté).

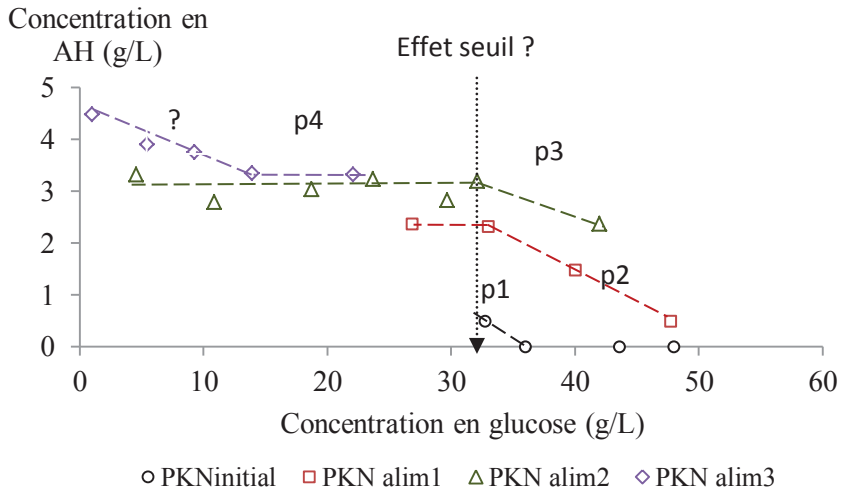


Figure 11. Production d'AH en fonction de la concentration résiduelle en glucose (3 alimentations échelonnées) sur des cultures bactériennes en milieu PKN et milieu LAI (souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus).

En définitive, 100 g/L de glucose (contre 70 g/L sur l'essai précédent) ont donc été convertis en AH, biomasse et produits du métabolisme central par la souche ATCC 39920. Le milieu PKN est donc un milieu plus « complet » que le milieu LAI, qui permet de mieux maintenir l'activité catabolique et anabolique chez *Streptococcus zooepidemicus*.

Les taux de recouvrement carboné calculés montrent une tendance de répartition des flux carbonés différente des essais précédents. Ainsi, 90 % des flux carbonés, sont dirigés vers la production de lactate (contre 80-85 % sur les essais précédents), 3 % vers la production d'acétate et 2 % vers la production de biomasse (contre 5-6 % sur les essais précédents). Il apparaît néanmoins que la proportion du flux carboné orienté vers la production d'AH est

stable quel que soit l'apport en glucose (5-7 %). Le mode d'alimentation a donc un impact non négligeable sur la répartition des flux métaboliques au sein de la cellule. La production de lactate est un indicateur d'équilibre rédox et même si des niveaux bas en oxygène dissous sont relevés au cours de la culture bactérienne, ces conditions ne sont pas nécessairement relatives à une limitation. Ainsi, la quantité d'oxygène apportée est probablement suffisante (sans pour autant être optimale) pour maintenir un équilibre rédox propre à la production d'AH.

Enfin, la taille moléculaire (Tableau 7) n'est pas modifiée dans ces conditions de culture. Ces résultats vont dans le sens de notre postulat proposant qu'à une souche donnée de *Streptococcus zooepidemicus,* correspondrait une gamme particulière de tailles moléculaires d'AH produit. D'autres résultats, dans des conditions de cultures différentes, devront confirmer cette hypothèse.

Le mode d'ajout de la source énergétique et potentiellement carbonée (glucose) a ici été abordé. Il apparait que l'ajout de glucose de manière échelonnée au cours du temps permet d'améliorer très légèrement les concentrations maximales en AH produit et sensiblement les « rendements » de production d'AH par rapport à un ajout de tout le substrat à l'état initial. Ceci est corrélé à une diminution de la production de biomasse et par conséquent à une modification de l'équilibre des flux métaboliques au sein de la cellule. Néanmoins, **les moyens de mise en œuvre que sous-tend un tel type de culture en discontinu avec alimentation échelonnée, ne permettent pas de justifier la faible plus-value qu'elle engendrerait**. En effet, d'une part le rendement de conversion du glucose en AH est très largement réduit (- 35 %) sur ce type de culture ; 0,062 g AH sont produits par g de glucose au cours du procédé de production en discontinu à CIG 50 ; 0,061 g AH / g de glucose en discontinu à CIG 70 et enfin 0,04 g AH/ g de glucose à CIG 50 avec alimentation échelonnée. Ce qui représente une diminution non négligeable de plus de 30 %. D'autre part la production finale d'AH n'est améliorée que de 4 % et la taille moléculaire moyenne de l'AH produit n'augmente pas de manière significative.

L'hypothèse de l'existence d'un effet seuil (glucose) à 30 g/L a pu être avancée. Néanmoins, les résultats apportés ne permettent pas de confirmer catégoriquement cette hypothèse. En effet, un maintien de l'activité catabolique et anabolique après épuisement du glucose est tout

de même constaté (après interruption de la synthèse d'AH). La mise en place d'essais complémentaires sera nécessaire dans le but d'étudier plus précisément ces phénomènes de limitation, de variation ou d'effet seuil.

En complément, différentes informations ont pu être apportées ou confirmées grâce à l'étude concernant le mode d'alimentation en glucose. (1) L'effet de l'oxygène sur la production d'AH est une composante du système de production de l'AH qui doit être approfondie. (2) Le mode d'alimentation et la quantité de substrat « glucose » apportée n'ont pas d'effet notoire sur la taille moléculaire de l'AH. Comme déjà supposé, une dépendance taille d'AH/souche existe très probablement.

6. Etude de l'influence de l'aération sur la production d'acide hyaluronique par *Streptococcus zooepidemicus*

L'influence de l'oxygénation sur la production d'AH par voie microbienne a été soulevée de nombreuses fois au cours des essais précédents. En effet, il est apparu que l'action de la NADH oxydase (NOX) jouait très probablement un rôle important sur le maintien de l'équilibre rédox au sein de la cellule et ainsi sur la production d'AH. Néanmoins, le rôle exact de l'oxygène, pour ce cas métabolique, reste flou si l'on se fie à la littérature. Amélioration du transfert d'oxygène et donc de la production d'AH (Duan et al., 2009) ? Effet toxique sur la production d'AH par l'action dépolymérisante des dérivés réactifs de l'oxygène (Jahn et al., 1999 et Zhang et al., 2010) ? Contrôle biphasique de l'oxygénation pour favoriser la croissance dans un premier temps puis la production d'AH dans un second temps (Liu et al., 2008) ?

Cette problématique n'a pu être résolue au cours des essais précédents. La production d'AH est quasi systématiquement initiée lorsqu'un seuil de pO_2 bas est atteint. Les cellules sont alors probablement en limitation d'oxygène mais il est difficile de savoir si cette limitation en oxygène est due à la production d'AH et par conséquent à une activité métabolique intense ou, au contraire, si la production d'AH s'initie en raison d'une limitation en oxygène dissous dans le milieu de culture.

Dans l'objectif de répondre à cette question, il est nécessaire de travailler dans des conditions de transfert d'O_2 améliorées, ceci impliquant un durcissement des conditions physiques d'aération et d'agitation.

Dans ces conditions, le problème va tenir au fait que cette amélioration du transfert d'oxygène aura potentiellement une incidence sur la molécule d'AH du fait de conditions hydrodynamiques et chimiques imposées (action délétère due aux contraintes de cisaillement mais aussi aux dérivés toxiques de l'oxygène).

Choix d'un système de contrôle de l'aération et modification des mobiles d'agitation

Un essai en bioréacteur Applikon de 3 L dans des conditions définies comme étant de référence (milieu LAI, 50 g/L de glucose, pH 7, 37 °C, mesure du rH) a été mis en œuvre. La consigne de seuil bas en oxygène dissous est rehaussée à 50 % par rapport aux essais précédents. Dans ce cas, la régulation est effectuée en amont par injection d'air comprimé (augmentation de 0,25 à 1 vvm) puis, si besoin, par injection d'oxygène pur. Comme spécifié dans le « Matériel et méthodes » (partie II), des mobiles d'agitation à pales de type Rushton ont été utilisées au cours de tous les essais précédents, en bioréacteurs. Afin de compléter cette étude sur l'influence du transfert d'oxygène, l'agitation est assurée soit par un système de pales Rushton (témoin de l'effet seuil de pO_2 fixé à 50 %), soit par un système de mobiles d'agitation à pales inclinées (géométrie définie au laboratoire), couplées à des mobiles d'agitation à « oreilles d'éléphant » (Figure 12).

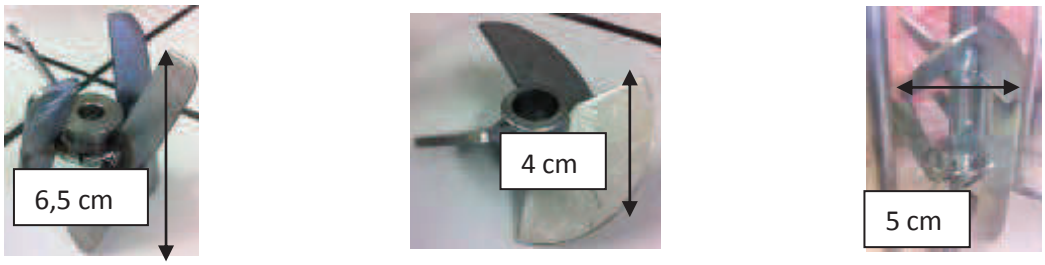


Figure 12. Photographies des mobiles d'agitation mis en œuvre. A gauche : pales inclinées. Au centre : « oreilles d'éléphant ». A droite : disposition sur l'axe central.

L'utilisation de ce type de géométrie en pompage haut est justifiée par un souhait de diminuer les contraintes de cisaillement générées par les systèmes de pales Rushton tout en favorisant le transfert d'oxygène. L'association de deux turbines, à pales inclinées et en oreilles d'éléphant, permettra en théorie une meilleure homogénéisation du milieu de culture sur toute

sa hauteur. Les effets de ce nouvel environnement hydrodynamique sur la production d'AH, et tout particulièrement sur les tailles moléculaires, sont étudiés.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
24 h	3 L	LAI (CIG 50 g/L)	37 °C	Contrôlé à 7	0,25 à 1 vvm	400 tr/mn

Souche mise en œuvre : ATCC 39920.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique. Détermination de la taille moléculaire.

Les résultats obtenus sont synthétisés dans le *Tableau 8*. Les cinétiques associées sont détaillées dans la Figure 13.

Tableau 8. Récapitulatif des résultats obtenus suite aux essais d'amélioration des conditions hydrodynamiques sur des cultures en bioréacteur de la souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus.

Milieu	Conditions	$[AH]_{max}$ (g/L)	Taille moléculaire (MDa)	$[X]_{max}$ (g/L)	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)	Recouvrement C total (%)	Durée de culture (h) $[AH]_{max}$	πAH_{max} (g/g.h)
LAI	Rushton pO_2 10 %	3,1	2,4	1,5	2,1	95	9	1,37
	Rushton pO_2 50 %	**3,7**	**2,2**	**1,4**	**2,6**	**92**	**25**	**1,40**
	Pales inclinées pO_2 50 %	**4,1**	**2,5**	**1,2**	**3,4**	**93**	**25**	**1,40**

Document confidentiel

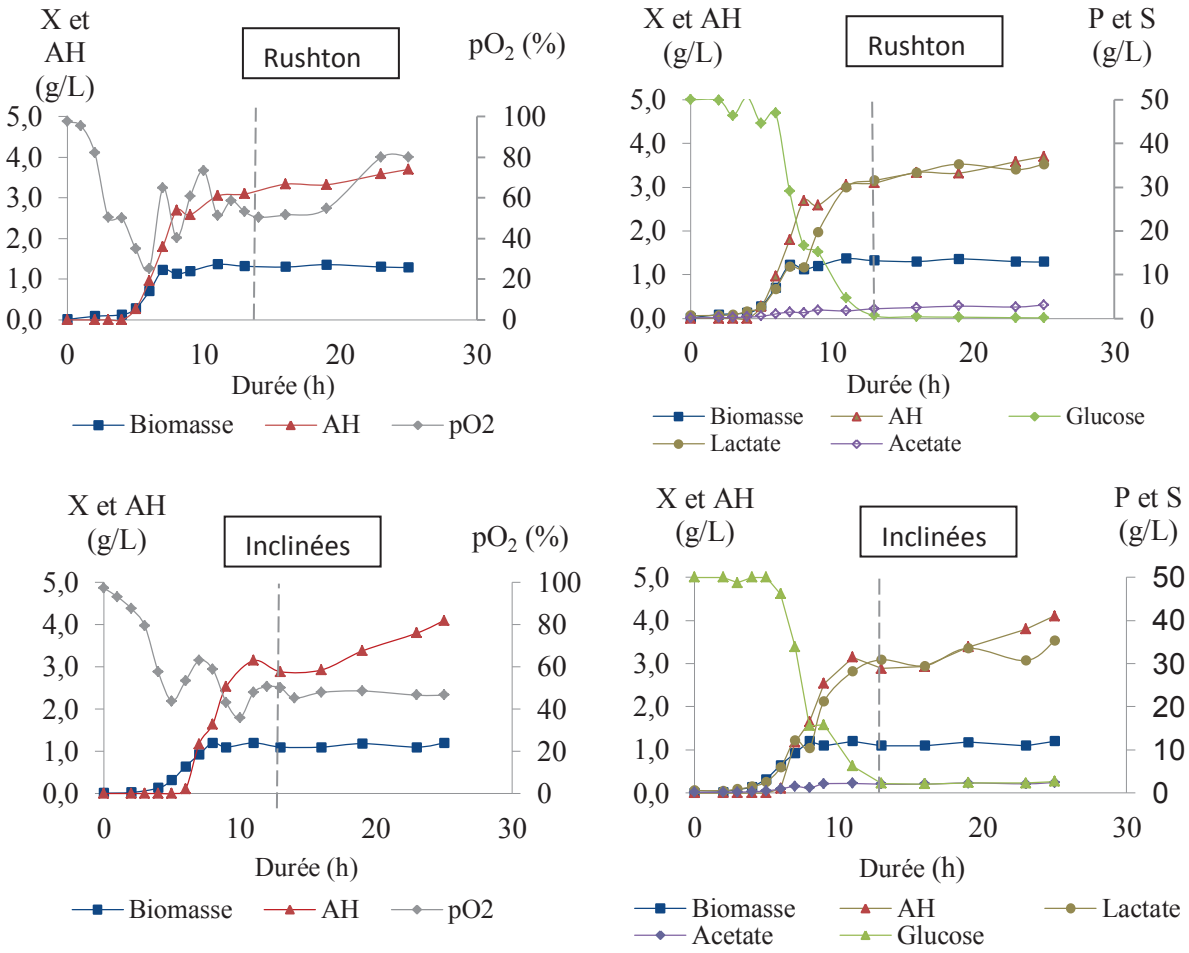


Figure 13. Effet de la nature du mobile d'agitation (pales inclinées ou pales Rushton) ainsi que de l'oxygénation (augmentation de la limite basse à 50 %) sur des cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé) - Souche ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus*– milieu LAI.*

Choix d'un système de contrôle de l'aération

La Figure 13 montre que le maintien de la pO_2 au-delà d'un seuil limite de 50 % est possible grâce à une injection d'oxygène pur (2ème niveau de régulation à 1 vvm d'injection d'air comprimé) et ce quel que soit le type de pales utilisées. L'augmentation de la consigne basse en oxygène dissous de 10 à 50 % (*Tableau 8*, essais avec pales Rushton) permet d'augmenter de manière significative :

- la production d'AH de 3,1 à 3,7 g/L,
- les « rendements » de production de 2,1 à 2,6 g AH par g de biomasse (soit plus de 20 %),
- de maintenir une dynamique de production d'AH même après épuisement du glucose.

La vitesse spécifique maximale de production d'AH n'est pas améliorée de manière significative dans ces conditions (1,37 et 1,40 g AH par g de biomasse et par heure). Le poids moléculaire mesuré est similaire à l'essai témoin (2,2 MDa contre 2,4 MDa). L'oxygène a donc un effet stimulant sur le métabolisme de croissance et de synthèse de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*. Cette augmentation du taux d'oxygénation n'a, néanmoins, aucune influence sur la taille moléculaire (ni dégradation du biopolymère, ni amélioration significative du poids moléculaire).

La production d'AH n'est donc pas initiée par une limitation en oxygène, mais au contraire, elle s'accompagne d'une importante vitesse spécifique de consommation d'oxygène. Cette production est améliorée dans des conditions « non limitantes » en oxygène qui permettent d'observer un maintien de l'activité métabolique même après épuisement du glucose.

Modification des mobiles d'agitation

Par la suite, nous pouvons observer (toujours au moyen de la Figure 13 et du *Tableau 8*) que la production d'AH est améliorée de 3,7 à 4,1 g/L (environ 10 %) en utilisant un système de pales inclinées. La biomasse maximale atteinte est légèrement réduite par rapport à l'essai sur pales Rushton. Le « rendement » de production d'AH est par conséquent amélioré de 2,6 à 3,4 g d'AH / g de biomasse, soit plus de 30 %. Enfin, la vitesse spécifique de production de l'AH se voit maintenue en comparaison à la culture avec des pales Rushton (1,4 g d'AH par g de biomasse et par heure). Le système de pales inclinées, tout comme le niveau d'oxygénation, n'améliorent donc pas la vitesse spécifique maximale de production d'AH. De plus, cet essai confirme qu'une amélioration des conditions d'oxygénation, permet, après épuisement du glucose, de maintenir une production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*.

Les tailles moléculaires d'AH produit ne sont que légèrement améliorées avec un système de pales inclinées. En effet, les tailles moyennes mesurées atteignent 2,5 MDa contre 2,2 MDa avec le système de pales Rushton. Une augmentation de la taille moléculaire de près de 14 % est donc observée par rapport à l'essai témoin en lien probable avec des contraintes de cisaillement imposées diminuées avec les pales de type « inclinées ».

Le mobile d'agitation à pales inclinées de différents types est donc « compatible » hydrodynamiquement dans un cadre de production de molécules, sensibles aux contraintes de cisaillement, telles que l'AH. En effet, il ne nuit pas aux capacités de production de l'AH par les cellules (vitesses spécifiques de production de l'AH équivalentes) et permet, dans le cadre de nos conditions opératoires, d'atteindre des niveaux d'oxygène dissous satisfaisants pour la poursuite de l'étude. Le couplage pales inclinées/pales « oreilles d'éléphant » est maintenu pour les essais à suivre. La mise en place d'un plan d'expériences complet permettra de définir les rôles éventuels des contraintes de cisaillement et du transfert d'oxygène sur la production d'acide hyaluronique de hauts poids moléculaires.

7. Etude de l'influence croisée des facteurs oxygénation et vitesse d'agitation sur la production d'AH

D'après les études précédentes, la limitation en O_2 est consécutive aux voies métaboliques empruntées pour la production d'AH puisque nous avons pu observer un effet positif d'une augmentation de la consigne limite basse en pO_2 sur la production d'AH. De plus, la substitution des pales Rushton par des pales inclinées permet également d'augmenter les performances du procédé de production. Mais dans quelle mesure ces observations sont elles valides ? Et est-ce qu'une augmentation du transfert d'oxygène par augmentation des consignes d'aération et de vitesse d'agitation n'aurait pas des effets délétères en termes de taille (augmentation des contraintes de cisaillement) ?

L'objectif de cette seconde étape tend donc à rechercher un optimum de production (d'un point de vue quantitatif et qualitatif) en fonction de la consigne en pO_2 et de la vitesse d'agitation. En effet, la controverse, existant dans la littérature, sur le rôle de l'oxygène au cours de la production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*, nous conduit à étudier le facteur « seuil limite bas en pO_2 » au cours de ce plan d'expériences afin de définir plus précisément si l'oxygène en excès pourrait avoir un effet dénaturant sur la molécule d'AH (Jahn et al., 1999). L'influence de la vitesse d'agitation sera de même étudiée au cours de cet essai afin de préciser l'impact d'éventuelles contraintes de cisaillement sur la taille

moléculaire de l'AH ou l'effet de l'amélioration du transfert d'oxygène au sein du bioréacteur sur la production d'AH.

Le plan défini sous MODDE9 est un plan complet à 2 facteurs et 3 niveaux. Trois niveaux de consigne pour le maintien de la pO_2 à un seuil limite bas seront appliqués ; 25 %, 50 % et 75 %. Trois niveaux d'agitation à 200, 400 et 600 tr/mn seront appliqués. Deux réponses seront étudiées par analyse de surface (RSM), la production maximale d'AH ainsi que la taille moléculaire de l'AH produit. La résolution du plan d'expériences se fera selon un modèle de type quadratique. Les conditions de mise en œuvre pour les autres paramètres sont les suivantes.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Seuil pO_2	Agitation
24 h	3 L	LAI (CIG 50 g/L)	37 °C	Contrôlé à 7	0,25 à 1 vvm	Plan d'expériences	

Souche mise en œuvre : ATCC 39920.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique. Détermination de la taille moléculaire. **Mesure du potentiel d'oxydo-réduction. Mesure rhéologique.**

* Le seuil limite bas en pO_2 sera uniquement piloté par modulation du débit d'aération et injection transitoire d'O_2 pur. La valeur de la vitesse d'agitation est donc fixée.

Validité du plan

Les résultats obtenus permettent, d'une part, d'observer une bonne reproductibilité pour les deux réponses étudiées. D'autre part, la représentation quadratique proposée permet d'expliquer respectivement à 88 % et 97 % les données expérimentales obtenues concernant les réponses « taille moléculaire » et « concentration maximale en AH libre ». Les régressions linéaires obtenues révèlent la bonne adéquation entre les valeurs prédites et expérimentales sont donc acceptables pour les deux réponses étudiées (Figure 14). Un R^2 de 0,97 pour la réponse « concentration maximale en AH » montre que les facteurs étudiés ont

un impact prépondérant sur la production d'AH puisqu'ils permettent de modéliser de manière fiable une réponse aussi complexe. Le calcul de la taille d'AH étant une mesure de taille moyenne prenant en considération la polydispersité de la molécule, les résultats sont en contrepartie logiquement plus « bruités ». Ceci peut donc clairement expliquer les différences de R^2 entre taille moléculaire et concentration en AH.

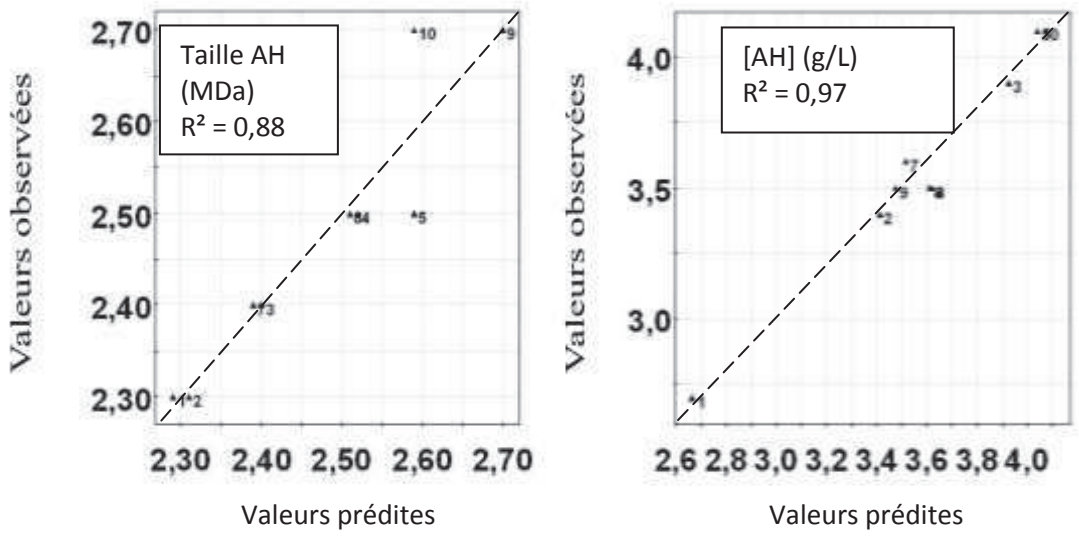


Figure 14. Définition des coefficients de détermination pour les réponses étudiées (taille moléculaire et concentration en AH). Expression des valeurs observées en fonction des valeurs prédites par le modèle quadratique.

Optimums et Surfaces de réponse

Le plan d'expériences complet ainsi que les résultats obtenus sont détaillés dans le Tableau 9. De manière globale, nous pouvons constater que les meilleurs résultats relatifs à la production d'AH sont atteints pour des vitesses d'agitation de 400 à 600 tr/mn et une consigne de maintien de la pO_2 intermédiaire de 50 %. L'influence des paramètres considérés reste relativement minime sur la réponse « taille moléculaire » (variation entre 2,3 et 2,7 MDa peut être due à l'erreur expérimentale).

Document confidentiel

Tableau 9. Synthèse des résultats obtenus pour le plan d'expériences étudiant l'influence croisée des facteurs « seuil limite bas en pO_2 » et « vitesses d'agitation ».

Vitesse d'agitation (tr / mn)	pO_2 (%)	[AH] (g/L)	Taille moléculaire AH (MDa)	π AH (g/g.h)	$[X]_{max}$ (g/L)	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)
Réf : 400	Réf : 10	3,0	2,4	1,37	1,01	2,97
200	25	2,7	2,3	0,90	1,12	2,41
600	25	3,9	2,4	1,24	1,46	2,67
200	75	3,6	2,4	1,32	1,31	2,75
600	75	3,5	2,7	1,33	1,09	3,21
200	50	3,5	2,5	1,70	1,24	2,82
600	50	4	2,3	1,53	1,74	2,3
400	25	3,4	2,3	1,22	1,17	2,91
400	75	3,5	2,5	1,51	1,34	2,61
400	50	4,1	2,5	1,40	1,18	3,47
400	50	4,1	2,7	1,84	1,13	3,63

Les résultats présentés (*Figure 15*), ont pour objectif d'exprimer les réponses « taille moléculaire de l'AH » et « concentration de l'AH » en fonction de l'action croisée des facteurs « vitesse d'agitation » et « seuil limite bas de régulation de la pO_2 ». Nous pouvons observer qu'une optimisation de la répartition des surfaces pour les deux réponses étudiées impliquerait de travailler aux vitesses d'agitation maximales du domaine expérimental (600 tr/mn) voire à des valeurs de rotation supérieures non explorées dans le cadre de ce plan. En ce qui concerne le facteur de seuil limite bas de régulation de la pO_2 nous pouvons observer qu'un niveau intermédiaire entre les niveaux 0 et 1 (environ 65 % de la saturation en O_2) associé à un niveau haut de vitesse d'agitation (600 tr/mn) permet d'améliorer la réponse « taille moléculaire de l'AH ». Parallèlement un niveau intermédiaire, entre 40 et 50 %, pour le seuil limite bas en pO_2 (40 % environ de la saturation en O_2) et grande vitesse d'agitation (600 tr/mn) serait plus propice à l'amélioration de la réponse « concentration en AH ».

Document confidentiel

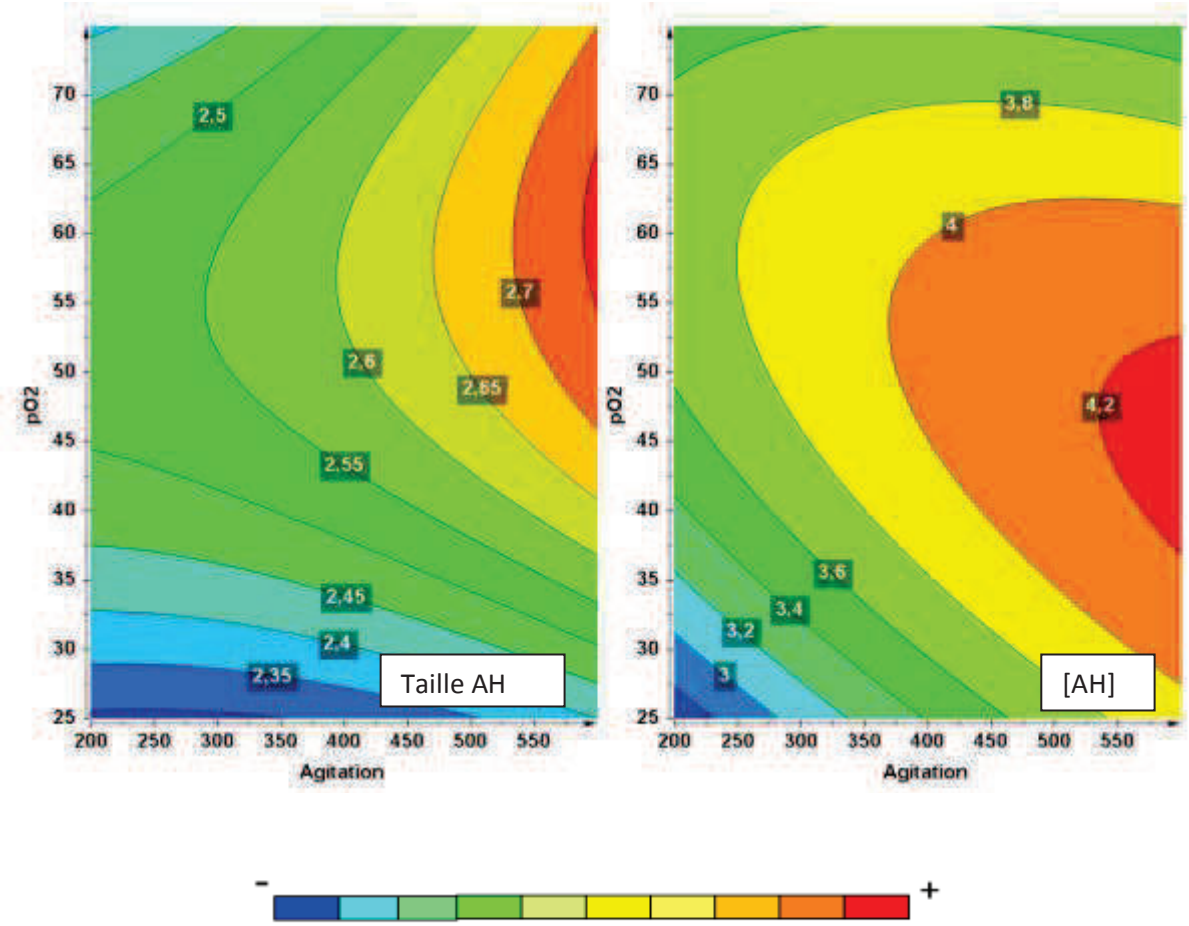


Figure 15. Expression des surfaces de réponse obtenues au cours de l'étude de l'effet croisé des facteurs «vitesse d'agitation» (tr / mn) et «seuil limite bas de régulation de la pression partielle en oxygène dissous» (%). Les réponses exprimées sont la taille moléculaire en MDa (à gauche) et la concentration en AH en g/L (à droite).

Pour aller au-delà de ces observations, nous avons fait le choix de réaliser une optimisation multicritère à l'aide du logiciel Modde9. Nous avons ainsi pu rechercher les conditions optimales, dans le domaine expérimental initialement défini, pour une optimisation simultanée de la réponse poids moléculaire de l'AH et concentration finale en AH. Cette optimisation n'inclut évidemment pas les points extérieurs au domaine expérimental et ne considère pas que la réponse puisse être optimisée à des vitesses d'agitation supérieures à 600 tr/mn. Les résultats sont présentés dans le *Tableau 10* et mettent en avant qu'une concentration finale de 4,2 g/L avec une moyenne de répartition des tailles moléculaires proche de 2,8 MDa pourrait être atteinte pour une vitesse d'agitation paramétrée à 600 tr/mn et un seuil limite bas pour la régulation de la pO_2 fixé à 55 % de saturation (souche ATCC 39920). Ces paramètres montrent que la vitesse d'agitation pourrait avoir un impact positif sur les tailles moléculaires

Document confidentiel

d'AH produit en favorisant le transfert d'oxygène avec un effet mineur de dégradation mécanique de l'AH produit.

Tableau 10. Résultats obtenus au cours de l'optimisation multicritère lors de l'étude de l'effet croisé des facteurs «vitesse d'agitation» et «seuil limite bas de régulation de la pression partielle en oxygène dissous» sur les réponses de taille moléculaire et de concentration de l'AH produit par voie microbienne.

Agitation (tr/mn)	pO_2 (%)	AH concentration (g/L)	AH taille (MDa)
600	55	4,19	2,75

Des optimums intéressants ont pu être identifiés pour le procédé. Ces données feront l'objet d'une étude plus particulière dans le cadre de la validation des conditions opératoires définies, du milieu de culture formulé ainsi que du mutant retenu pour une exploitation à plus grande échelle.

Interprétation « physiologique »

L'objectif ici, est de comparer les cinétiques du plan d'expériences dans les conditions extrêmes des réponses obtenues pour identifier les causes de ces résultats (performances minimales à 200 tr/mn et 25 % d'oxygène dissous ; performances maximales pour un des points centraux du domaine – 400 tr/mn et 50 % de consigne de pO_2). Le suivi de la pression partielle en oxygène dissous dans le milieu de culture est présenté dans la Figure 16 A et B. Les données de mesure du potentiel d'oxydo-réduction sont aussi exprimées (Figure *16* C et D).

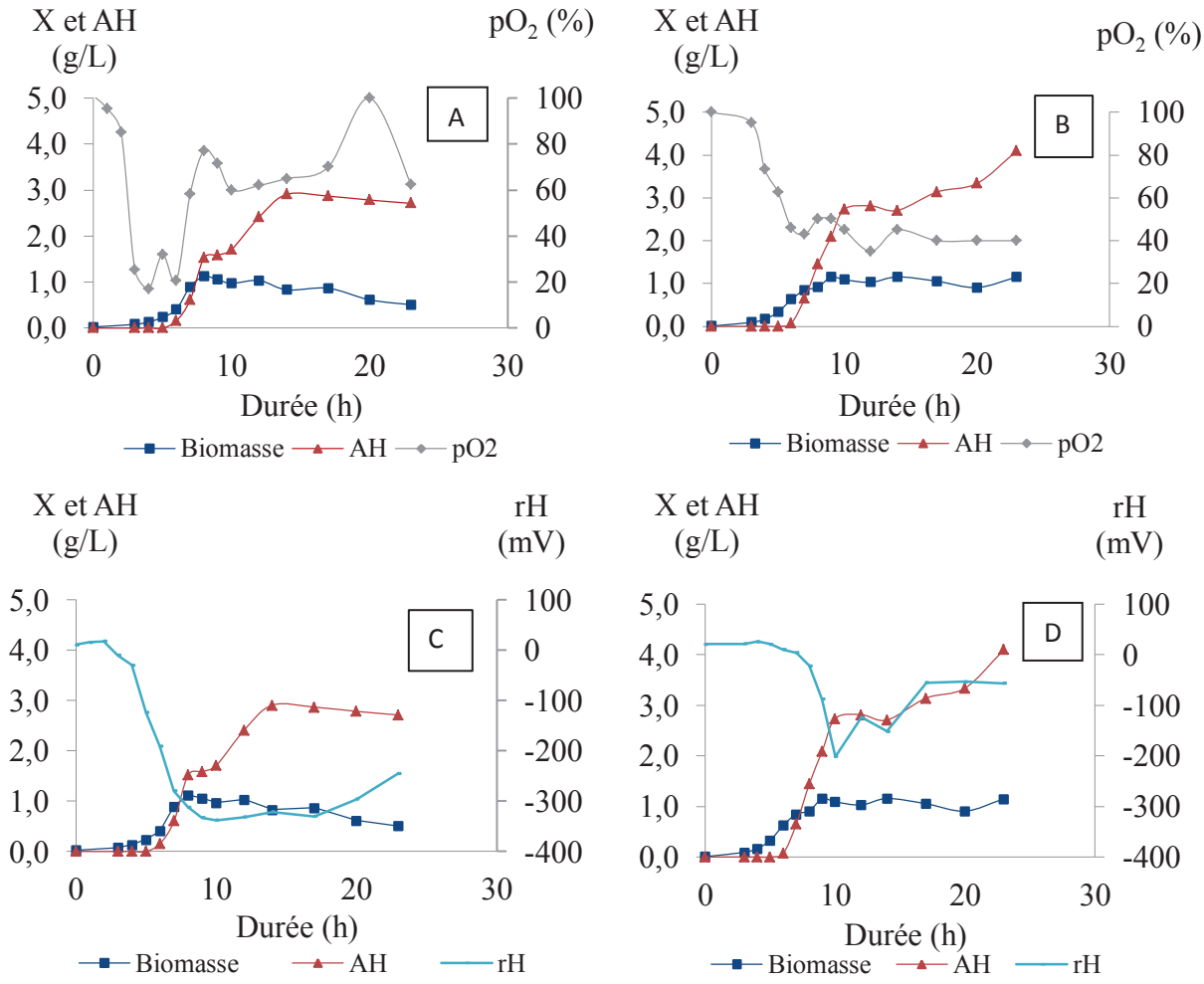


Figure 16. Cinétiques comparées de la « croissance » cellulaire, de la production d'AH, de la pO_2 et du potentiel d'oxydo-réduction au cours de cultures de Streptococcus zooepidemicus mises en œuvre en bioréacteur de 3 L. Comparaison des essais (400 tr/mn ; 50 % OD) (B et D) et (200 tr/mn ; 25 % OD) (A et C) du plan d'expériences défini.

Premièrement, nous pouvons observer que, dans les deux cas, les cinétiques de production de biomasse sont comparables. Ensuite, dans des conditions où les performances de production d'AH sont réduites (200 tr/mn, seuil à 25 % d'OD) nous pouvons noter que la production d'AH se fait de manière quasi continue, et ce, en parallèle de la production de biomasse, pour atteindre une valeur maximale de 2,9 g/L. Dans le cas où les performances de production d'AH sont améliorées, les cinétiques montrent une production biphasique notable avec réduction de la pente dans un second temps.

Comme nous avons pu le voir jusqu'ici, l'environnement rédox de la cellule peut avoir un large impact sur la production d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*. En effet, Les bactéries lactiques qui possèdent la NADH oxydase peuvent réduire l'oxygène en eau (réaction de réduction associée à la ré-oxydation du NADH). Ce processus de couplage entre

oxydation et réduction via des co-enzymes oxydo-réducteurs, influence à la fois l'environnement rédox intracellulaire et extracellulaire, et peut se traduire par un changement dans la physiologie cellulaire. L'étude du potentiel rédox permet ici de savoir ou non si les cellules sont sensibles à l'oxydation du milieu. Concrètement, des potentiels rédox plus élevés sont observés en cas de teneur élevée en oxygène alors que des rédox bas sont le fait d'un manque d'oxygène lié à des processus de réduction.

Les résultats présentés montrent une nette différence de profil cinétique. Dans le premier cas, lorsque les « rendements » de production en AH sont faibles (200 tr/mn, 25 % OD), le potentiel rédox diminue en association avec la croissance puis se stabilise presque tout au long de la culture bactérienne (amplitude d'environ 350 mV, valeur plancher de - 338 mV). Dans un second cas de niveau élevé de production, la diminution du rH est de plus faible amplitude et l'environnement extracellulaire devient rapidement oxydant (180 mV d'amplitude, stabilisation à - 201 mV). Cette diminution du rH est qui plus est associée à la production d'AH.

Comme supposé au préalable, un environnement oxydant favoriserait la production d'AH à l'inverse d'un environnement réducteur. Mais comment expliquer cette différence de profil rédox entre ces deux essais ? Ceci pourrait être lié à une différence de production d'un métabolite à fort pouvoir réducteur (non dosé) et/ou, si l'on s'en réfère aux profils d'évolution de la pO_2, dépendre du transfert d'oxygène et de l'action des NADH oxydases. Dans ce dernier cas, l'influence positive d'une importante oxygénation sur la production d'AH chez la bactérie lactique *Streptococcus zooepidemicus* serait démontrée.

Des mesures rhéologiques ont donc été envisagées afin d'effectuer des calculs théoriques des K_La (fluides non newtonien) associés à ces productions au niveau de ces deux cultures. Ces mesures ont été effectuées au moment où les vitesses spécifiques de production d'AH étaient les plus élevées ainsi qu'en fin de culture microbienne pour ces deux cas d'étude. Les résultats sont présentés en Figure 17.

Nous pouvons constater, dans un premier temps, qu'en fin de culture, la viscosité dynamique à taux de cisaillement faible est plus élevée dans les conditions où la production d'AH est améliorée (400 tr/mn ; 50 % OD). Nous observons ainsi à un taux de cisaillement de 0,1 s^{-1}, une viscosité dynamique de 2,84 Pa.s et 0,192 Pa.s pour les essais (400 tr/mn ; 50 % OD) et

(200 tr/mn ; 25 % OD) respectivement. Ceci est donc cohérent avec les concentrations en AH et les tailles produites.

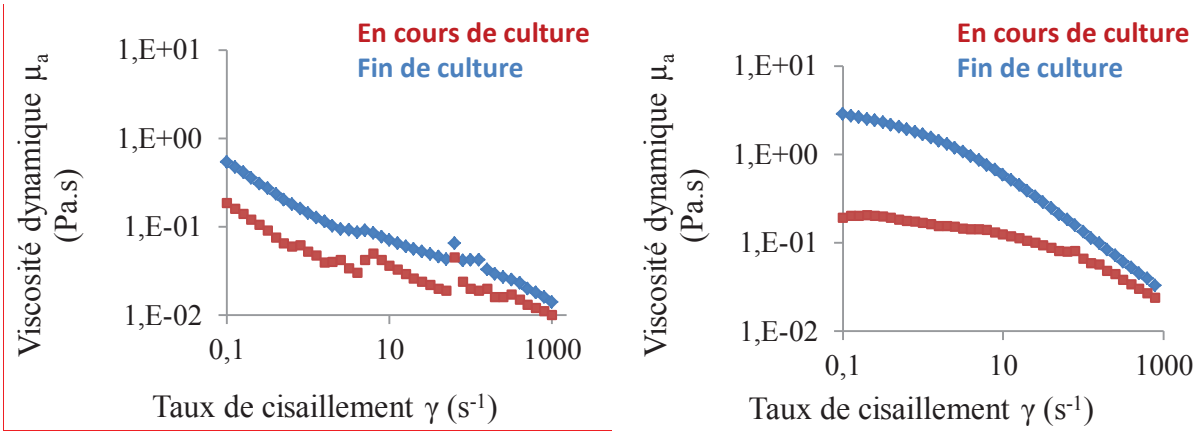


Figure 17. Représentation graphique de la viscosité dynamique en fonction du taux de cisaillement moyen appliqué. A gauche : condition (200 tr/mn ; 25 % OD) du plan d'expériences concernant l'étude de l'influence de la pO_2 et de la vitesse d'agitation sur la production d'AH. A droite : condition (400 tr/mn ; 50 % OD).

Dans un second temps, nous pouvons observer qu'à des temps moins avancés pour lesquels les vitesses spécifiques de production d'AH sont maximales, la viscosité dynamique des milieux de culture est logiquement plus faible. Les coefficients de transfert d'oxygène au sein des deux bioréacteurs pour ces deux temps (déterminée à π AH_{max} et aux temps finaux) ont été calculés à titre indicatif (mélange non-homogène). Les données sont résumées dans le Tableau 11. Pour de tels fluides définis comme non-newtoniens et donc associés à un régime turbulent ($Re < 10^4$), ces calculs (détaillés dans la partie I - « Etude Bibliographique »), impliquaient au préalable de calculer le cisaillement moyen appliqué dans chaque condition dans le bioréacteur pour en déduire, via les mesures rhéologiques et la loi de puissance qui en découle, les valeurs de viscosité dynamique associées. Nous pouvons observer que :

- comme cela était présumé, les coefficients de transfert d'oxygène diminuent au cours du temps, et ce, en association avec l'augmentation de la viscosité du milieu de culture et,
- qu'il y a effectivement un taux de transfert d'oxygène plus élevé pour la condition améliorée à 400 tr/mn et 50 % en seuil limite bas de pression partielle en oxygène dissous. Ainsi, aux temps où la vitesse spécifique de production d'AH est maximale, nous observons une amélioration d'un facteur 3 des coefficients de transfert d'oxygène dans ces conditions (30,2 h^{-1} pour 10,5 h^{-1} en condition non optimale).

Document confidentiel

Ces résultats permettent d'expliquer les différences d'environnement rédox retrouvées dans les deux conditions de culture comparées et tend à démontrer qu'un environnement plus oxydant permettrait d'améliorer de manière significative la production d'AH. L'influence positive du taux d'oxygénation en lien direct avec le potentiel d'oxydo-réduction retrouvé dans le milieu de culture est donc ici mise en avant.

Tableau 11. Résumés des données rhéologiques et hydrodynamiques obtenus à l'aide de la méthode théorique de calcul des coefficients de transfert d'oxygène pour un fluide défini comme non-newtonien.

Essai (tr/mn / % O_2)	Viscosité dynamique (Pa.s) à $\gamma = 0,1$	Re	Cisaillement moyen (s^{-1})	Viscosité dynamique associée (Pa.s)	P_0	P_g	K_La (h^{-1})
200/25 (6 h)	0,185	189	67	$4,50.10^{-2}$	$5,93.10^{-2}$	$8,37.10^{-3}$	10,5
400/50 (8 h)	0,542	455	133	$3,75.10^{-2}$	$4,74.10^{-1}$	$6,03.10^{-2}$	30,2
200/25 (23 h)	0,192	108	67	$7,90.10^{-2}$	$5,93.10^{-2}$	$8,37.10^{-3}$	8,4
400/50 (23 h)	3,840	180	133	$9,50.10^{-2}$	$4,74.10^{-1}$	$6,03.10^{-2}$	20,8

Après avoir mis en évidence l'association d'une demande en oxygène avec la production d'AH, nous avons, par le biais d'un plan d'expériences, étudié les effets croisés de l'aération et de la vitesse d'agitation. Des conditions opératoires, à approfondir, ont ainsi pu être définies dans le cadre du développement du procédé.

En parallèle, l'étude comparative entre des cinétiques productives, d'une part, et de moins bonne performance d'autre part, a mis en exergue le rôle de l'oxygénation dans le cadre de la synthèse d'AH avec une possibilité de pilotage par le suivi de la pO2 et du rédox. Ceci a été confirmé par la détermination de valeurs de K_La indicatives dans les conditions hautement et faiblement productives en AH et va dans le sens des observations sur le rôle du soufre minéral en conditions « non aérées », et donc sur l'intérêt d'un maintien d'un certain rapport NADH / NAD^+.

Document confidentiel

8. Conclusion

Dans ces **chapitres III et IV** consacrés à l'identification et à l'étude des phénomènes majeurs influant sur la production d'AH, une démarche au « un facteur à la fois » a été développée. En effet, une étude de l'influence croisée de tous les facteurs abiotiques ayant un effet potentiel sur la production d'AH était impossible. Une méthodologie a donc été développée avec :

- la sélection de groupes de facteurs ayant une influence notable sur la production d'AH (littérature),
- l'étude séparée de chacun de ces groupes de facteurs en maximisant l'utilisation d'outils permettant d'étudier les interactions entre les différents facteurs composant ces groupes pour enfin,
- mettre en place un essai appliqué final en considérant les différents résultats obtenus. Un objectif double est donc associé à cette méthodologie : comprendre l'influence des facteurs (phénomènes majeurs) et poser les bases du développement d'un procédé potentiel.

Les différents et principaux facteurs présentés dans la littérature comme influents sur la concentration maximale en AH produit, les « rendements » de production en AH ou encore les tailles moléculaires produites sont :

- le milieu de culture, constitué d'un large groupe de sous-facteurs qualitatifs ou quantitatifs tels que la nature des substrats apportés, les concentrations apportées ou encore le rapport « carbone / azote » moins étudié dans ce mémoire. Un milieu a ainsi été formulé dans l'optique d'une facilité d'utilisation aval (purification AH). Une amélioration de la production d'AH sur cette base de milieu a pu être démontrée en comparaison aux résultats de la littérature et deux problématiques majeures en ont résulté. D'une part, l'influence possible de l'oxygénation et plus précisément du potentiel d'oxydoréduction (équilibre NADH / NAD^+). D'autre part, la possibilité d'une limitation en glucose ;

- le mode de culture qui comprend des sous-facteurs étudiés tels que le mode de pré-culture ou le mode d'alimentation en substrat glucose. Ainsi, nous avons pu mettre en avant que la concentration en glucose pouvait être un facteur limitant au cours de la production d'AH. L'influence directe, sur l'orientation des flux métaboliques, de la concentration initiale en glucose ainsi que de l'ajout de certains précurseurs de la synthèse d'AH a de plus été mise en avant. Enfin, l'hypothèse d'un effet seuil a pu être soulevée mais nécessiterait une validation expérimentale en aval ;

- enfin, l'oxygénation / oxydation du milieu de culture. Nous avons vu qu'il était possible de fonctionner avec des systèmes d'aération impliquant le maintien d'un seuil de pO_2 élevé et non pas en fonctionnant en limitation (avec l'étude des effets croisés de facteurs associés tels que la vitesse d'agitation). Cette « levée de limitation » montre qu'un maintien de l'activité métabolique liée à la synthèse d'AH est possible. La comparaison des cinétiques obtenues avec la détermination des valeurs de K_La associés a confirmé les observations précédentes quant à la nécessité du maintien d'un certain équilibre NADH / NAD^+, observable et pilotable macroscopiquement par une combinaison pO_2-potentiel rédox.

D'un point de vue pratique, cette étude a permis de définir les bases d'un procédé complexe de production d'AH à l'échelle du laboratoire à partir de souches bactériennes de *Streptococcus zooepidemicus*. Des indicateurs de la production d'AH sont, de plus, ressortis et permettent de cibler plus précisément un « profil type » de souche surproductrice (production de biomasse, métabolisme lactique, consommation d'oxygène, profil rédox). L'effet très important du facteur « souche » sur la production d'AH a de plus été mis en avant avec des modifications multiples du modèle biologique au cours de cette étude liée au procédé (chapitre III et IV). Ainsi, l'influence croisée des différents groupes de facteurs présentés dans les chapitre III et IV et du facteur « souche » étudié dans le chapitre II sera donc explorée dans le chapitre V (partie « Résultats »).

Chapitre V

Sélection et mise en œuvre d'un modèle biologique performant sur la base des paramètres améliorés du procédé de production

Document confidentiel

SOMMAIRE – RESULTATS CHAPITRE V

1. INTRODUCTION 194

2. SELECTION D'UN MUTANT SURPRODUCTEUR SUR LA BASE DE CONDITIONS DE CULTURE DE REFERENCE 195

2.1. CARACTERISTIQUES GENERALES DES SOUCHES ETUDIEES 196
2.2. SELECTION D'UN MUTANT : MISE EN ŒUVRE EN CULTURES DISCONTINUES 197

3. VALIDATION EXPERIMENTALE DES TRAVAUX D'INGENIERIE DE SOUCHES ET DE DEVELOPPEMENT DU PROCEDE DE PRODUCTION D'AH 204

4. CONCLUSION 216

TABLE DES FIGURES

Figure 1. Positionnement des résultats du Chapitre V dans le cadre des études relatives au développement d'un procédé de production industriel d'AH par voie microbienne à l'échelle du laboratoire.....194

Figure 2. Cinétiques (AH, X)et évolution rH en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé,consigne basse en pO_2 de 10 %, mesure rH) - Souche 10062M9, MP1804.2, MP0205.1 et MP0205.2 – milieu LAI.....198

Figure 3. Droite de régression linéaire entre les recouvrements carbonés calculés et la taille moléculaire moyenne observée pour des cinétiques de culture de souches mutantes ayant observé une production d'AH ainsi que chez la souche de référence ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus en conditions de mise en œuvre identiques.....202

Figure 4. Cinétiques d'évolution de la taille moyenne des chaines d'acide hyaluronique en fonction du temps chez les souches mutantes MP0205.1 et MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus. 203

Figure 5. Evolution de la viscosité dynamique mesurée par rhéomètrie en fonction du taux de cisaillement Comparaison entre l'essai bilan de la présente étude est l'essai ayant observé les meilleurs rendements de production d'AH dans les études précédentes. 207

Figure 6. Cinétique de production d'AH et de biomasse en fonction de l'évolution de la taille moléculaire de l'AH. 209

Figure 7. Cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé, consigne pO_2 de 55 %, 70 g/L de glucose) - Souche ATCC 39920 – milieu PKN.....210

Figure 8. Droite de régression linéaire entre les recouvrements carbonés calculés et la taille moléculaire observée pour des cinétiques de culture de souches de ATCC39920 et MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus en conditions de mise en œuvre différentes.....212

Figure 9. Résultats schématiques des recouvrements carbonés observés au cours de la cinétique bilan mise en œuvre en bioréacteur de 3 L à partir de la souche MP0205.2.....213

Figure 10. Evolution de la pO_2 et du potentiel redox ainsi que de la production de biomasse et d'AH en fonction du temps.....214

Figure 11. Evolution de la viscosité dynamique (à gauche) et du coefficient de transfert d'oxygène (à droite) en fonction du temps au cours de cinétiques effectuées chez la souche MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus. 216

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Comparaison des principales caractéristiques macroscopiques observées pour des cultures sur milieu solide pour la souche de référence ATCC 39920 et des souches mutantes obtenues au cours des différentes campagnes de mutagénèse aléatoire (Chapitre II). 196

Tableau 2. Bilan comparatif des résultats obtenus après culture en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %) à partir des souches ATCC 39920, de la souche non hémolytique 10062M9 et des mutants MP1804.1, MP1804.2, MP0205.1 et MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus. 197

Tableau 3. Synthèse des principaux résultats obtenus suite à la mise en œuvre d'une souche mutante MP0205.2 de l'espèce Streptococcus zooepidemicus. Etude comparative aux essais précédents servant de référence.....205

Tableau 4. Synthèse des mesures rhéologiques de viscosité dynamique effectuées et des calculs de transfert d'oxygène qui en résulte.....215

CHAPITRE V : SELECTION ET MISE EN ŒUVRE D'UN MODELE BIOLOGIQUE PERFORMANT SUR LA BASE DES PARAMETRES AMELIORES DU PROCEDE DE PRODUCTION

1. Introduction

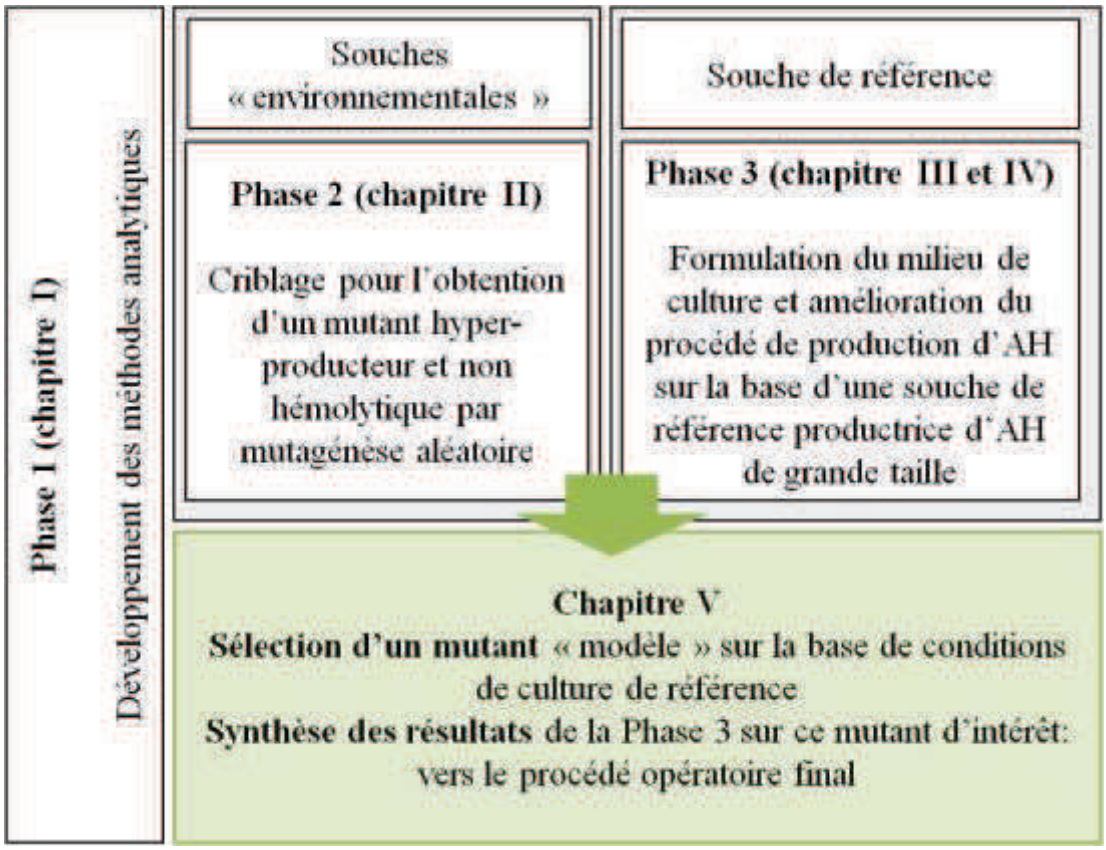


Figure 1. Positionnement des résultats du Chapitre V dans le cadre des études relatives au développement d'un procédé de production industriel d'AH par voie microbienne à l'échelle du laboratoire.

Le développement en parallèle des phases 2 et 3 décrit dans la Figure 1, a imposé, au fur et à mesure que les verrous scientifiques et techniques étaient levés, de valider certaines étapes de mutagénèse aléatoire sur la base du procédé en l'état, à ce temps « t » (application croisée entre la phase 2 et la phase 3). Le déroulé de ces différents essais en bioréacteurs de 3 L est décrit dans le présent chapitre. Ils seront axés sur deux étapes successives. Tout d'abord la sélection d'un mutant surproducteur performant (mutant issu des études présentées dans le Chapitre II de la partie « Résultats »). Afin de statuer sur les performances de production d'AH chez ces mutants présentant un phénotype de souches « surproductrices », des cultures seront mises en œuvre à l'échelle du bioréacteur de 3 L dans des conditions de

référence définies comme adéquates pour la production d'AH chez la souche modèle ATCC 39920 (partie « Résultats » - Chapitre III et IV). Une seconde phase opératoire sera ensuite dédiée à la synthèse expérimentale des travaux d'ingénierie de souches et d'amélioration du procédé de production d'AH sous la forme d'une « cinétique bilan ». Ces derniers résultats auront pour optique de se diriger vers la définition d'un procédé extrapolable final.

2. Sélection d'un mutant surproducteur sur la base de conditions de culture de référence

Cette étape amont de sélection d'un mutant d'intérêt sera basée sur des études cinétiques de la production d'AH (comparaison à un profil surproducteur type) ainsi que sur la détermination des performances globales de ces souches.

Toutes les expériences de cette étude ont donc été mises en œuvre en bioréacteur de 3 L dans des conditions de référence ayant permis d'observer une production d'AH de l'ordre de 3 g/L chez la souche ATCC 39220. En complément de la mesure de la taille moléculaire, des données concernant la polydispersité des molécules d'AH produites à un temps « t » seront fournies. Cette valeur représente la distribution de taille d'une population de particules. Plus elle est proche de 1, moins la répartition des tailles moléculaires est considérée comme disperse. Plus elle s'en éloigne, plus la gamme des tailles retrouvée sera large. Cette valeur est moyennée autour de 1,3 pour la molécule d'AH en solution tamponnée (donnée fournisseur). Des mesures rhéologiques sont, de plus, envisagées.

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	Aération	Agitation
24 h	3 L	LAI	37 °C	7	0,25 à 1 vvm	400 tr/mn

Souches mises en œuvre : souches environnementales et souches mutantes.

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique. Détermination de la taille moléculaire et de la polydispersité. Mesure du potentiel d'oxydo-réduction. Mesure rhéologique (si nécessaire).

2.1. Caractéristiques générales des souches étudiées.

Le Tableau 1 recense certaines caractéristiques d'intérêt, pour une exploitation à plus grande échelle dans le cadre d'un procédé de production d'AH par voie microbienne. Les souches mutantes obtenues au cours des différentes campagnes de mutagénèse aléatoire (partie « Résultats » - Chapitre II) sont ainsi comparées à notre souche de référence ATCC 39920. Le mutant 10062M9 a été retenu pour cette étude du fait de la perte de son caractère hémolytique. Les autres mutants ont été sélectionnés pour leur aspect « visqueux et translucide » (matrice d'AH) observé sur colonie.

Sur la base de ces premières observations macroscopiques (largeur de la matrice extracellulaire produite autour de colonies plus ou moins distinctes), il apparaîtrait que les mutants MP0205.1 et MP0205.2 soient des candidats d'intérêt dans le cadre de la production d'AH de haut poids moléculaire et à concentrations élevées.

Tableau 1. Comparaison des principales caractéristiques macroscopiques observées pour des cultures sur milieu solide de la souche de référence ATCC 39920 et des souches mutantes obtenues au cours des différentes campagnes de mutagénèse aléatoire (Chapitre II).

	Aspect sur colonie	Hémolyse
ATCC 39920 (témoin +)	Colonie imperceptible Large matrice translucide	NON
10062M9	Colonie crème	**NON**
MP1804.1	Petite colonie crème avec **matrice translucide**	OUI
MP1804.2	Petite colonie crème avec **matrice translucide**	OUI
MP0205.1	Colonie quasiment imperceptible Large **matrice translucide**	OUI
MP0205.2	Colonie quasiment imperceptible Large **matrice translucide**	OUI

2.2. Sélection d'un mutant : mise en œuvre en cultures discontinues.

La présente étude a pour finalité la sélection d'un mutant surproducteur aux performances de production d'AH les plus intéressantes. Cette souche fera l'objet d'une étude dans des conditions de mise en œuvre définies comme les meilleures (partie « Résultats » - Chapitre III et IV).

Les résultats obtenus après culture en bioréacteur de 3 L sont présentés (Tableau 2) et comparés aux résultats obtenus à partir de la souche ATCC 39920 de référence.

Tableau 2. Bilan comparatif des résultats obtenus après culture en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé, consigne basse en pO_2 de 10 %) à partir des souches ATCC 39920, de la souche non hémolytique 10062M9 et des mutants MP1804.1, MP1804.2, MP0205.1 et MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus.

	Rapport Acétate/ Lactate (g/g)	$[AH]_{max}$ (g/L)	Taille (MDa)	Poly-dispersité	$[X]_{max}$	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)	Recouvre-ment C (%)	πAH_{max} (g/g.h)
ATCC 39920	0,05	3,2	2,4	1,6	1,1	2,9	85	0,97
10062M9	1,30	nd	nd	nd	3,8	nd	37	nd
MP1804.2	0,06	1,5	0,7	1,3	2,1	0,7	96	0,12
MP0205.1	0,05	2,5	3,7	1,2	1,5	1,7	75	0,50
MP0205.2	0,10	2,5	4,0	1,2	1,3	1,9	67	0,60

En complément, les cinétiques de suivi de l'évolution de la production de biomasse et d'AH en fonction du rH sont présentées dans la Figure 2.

Un mutant (MP1804.1) n'a pas démarré sa croissance dans les conditions de culture de référence (données non présentées). Quatre mutants ont, par contre, bien initié leur croissance avec le milieu LAI. Parmi ces mutants, la souche MP0205.1 montre néanmoins une longue phase de latence qui ne peut être rationnellement expliquée. Les pré-cultures ayant été réalisées et vérifiées en parallèle des autres mutants, la mise en cause d'un état physiologique inadapté au démarrage de la culture est à écarter. Les essais n'ont pas été réitérés.

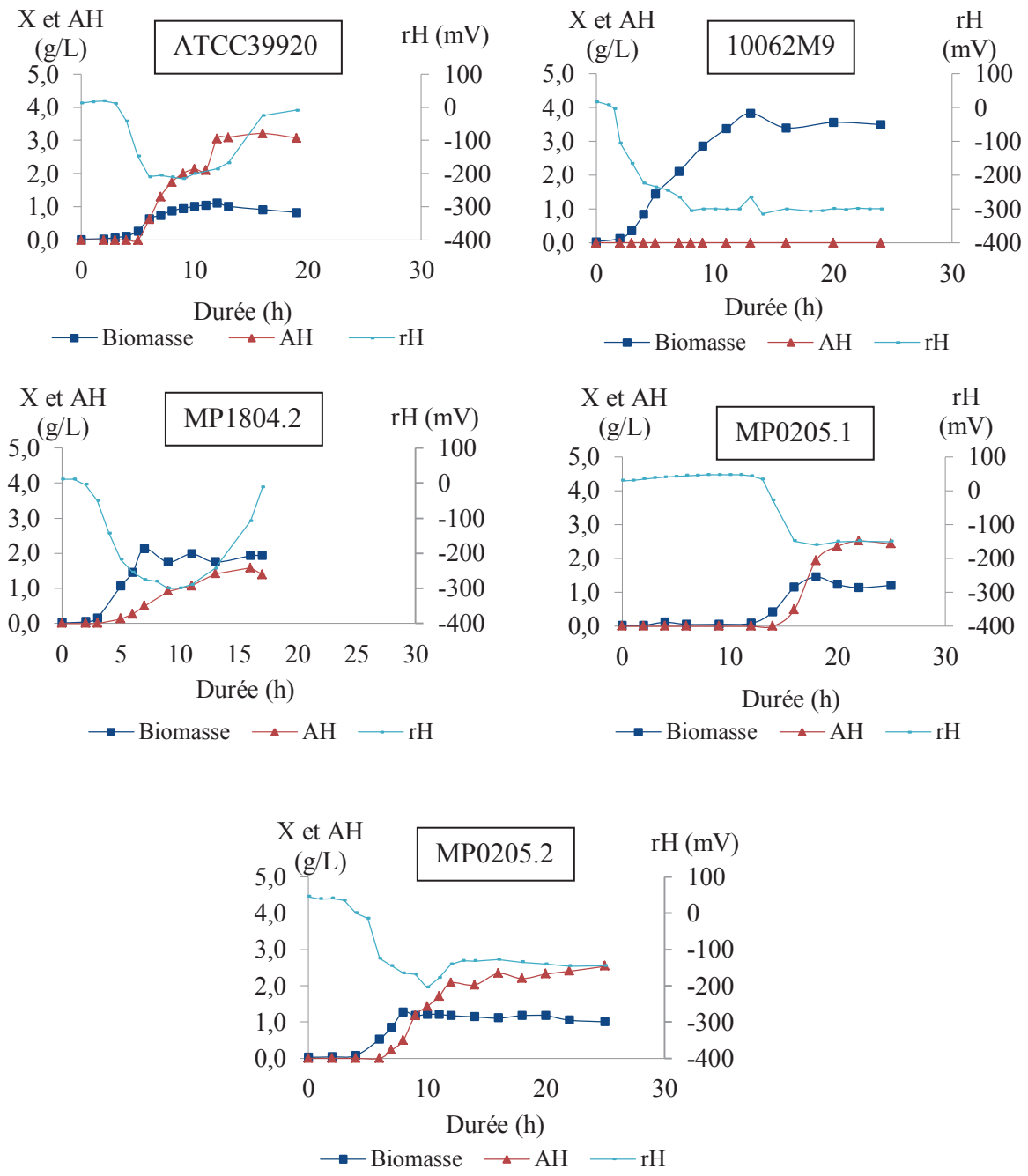


*Figure 2. Cinétiques (AH, X) et évolution rH en bioréacteur Applikon (3 L, pH régulé,consigne basse en pO_2 de 10 %, mesure rH) - **Souches 10062M9, MP1804.2, MP0205.1 et MP0205.2** – milieu LAI.*

Relevé d'indicateurs de la production d'AH comme base de sélection

Biomasse – recherche de concentrations faibles au regard de la compétition supposée avec la production d'AH

A l'exception du mutant 10062M9 non hémolytique ([X] = 3,8 g/L), les concentrations maximales en biomasse atteintes sont toutes du même ordre de grandeur et comparables à la souche de référence ATCC 39920 (entre 1 et 2 g/L). Si l'on considère ce premier critère de production de biomasse, les mutants MP0205.1 et MP0205.2 sont les plus à même d'être comparés à la souche ATCC 39920 ([X] < 1,5 g/L).

Rapport acétate / lactate – recherche d'un métabolisme lactique précis

Un second critère de sélectivité désigné comme représentatif des performances de production en AH est le métabolisme lactique observé et plus précisément le rapport acétate/lactate. A l'exception, une nouvelle fois, du mutant non hémolytique 10062M9 (1,3 g/g), ces rapports sont du même ordre de grandeur (0,05 g/g à 0,1 g/g) chez les mutants MP1804.2, MP0205.1 et MP0205.2 en comparaison à la souche ATCC 39920.

Mesure du rH – recherche d'un milieu oxydant

Dans ces conditions de culture, l'oxygène apparaît comme limitant pour chacune des cultures (données non présentées) et ne représente donc pas un critère discriminant pour la sélection de souches de haute performance de production en AH. Les cinétiques d'évolution du rH sont donc considérées. Il a été mis en évidence dans le chapitre précédent qu'une plus faible amplitude de variation du potentiel rédox, et donc un environnement plutôt oxydant en cours de culture microbienne, était favorable à la production d'AH. Au regard de cette condition, les souches présentant le plus d'intérêt (outre notre modèle d'étude ATCC 39920) seraient les mutants MP0205.1 et MP0205.2 (Figure 2). D'après les résultats de la Figure 2, il apparait qu'en plus d'être un éventuel indicateur d'un environnement propre à la production d'AH, l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction mesuré pourrait représenter un outil de pilotage des cultures microbiennes à plus grande échelle (début de la production d'AH, arrêt de la culture).

Tous ces indicateurs physiologiques mis en avant dans les études précédentes vont bien dans le même sens. Ils coïncident, de plus, avec les prévisions apportées par l'indicateur phénotypique observé et retenu pour la sélection de mutants surproducteurs d'AH (recherche de colonies presque imperceptibles entourées d'un large halo de matrice translucide et

visqueuse). Les mutants MP0205.1 et MP0205.2 semblent donc être les candidats les plus intéressants pour répondre aux objectifs fixés. Leurs performances de production concernant l'AH sont étudiées dans le paragraphe suivant.

Performances de production d'AH et interprétations physiologiques

Production d'AH – sélection d'un mutant d'intérêt

Les résultats relatifs aux performances de production d'AH (Tableau 2) confirment les tendances supposées sur la base des critères de « production de biomasse », « évolution du potentiel rédox » et de « rapport acétate/lactate » décrits dans le paragraphe précédent.

En effet, il apparaît que chez une souche non-hémolytique, mais dont la colonie ne présente pas le phénotype de « surproduction », la synthèse d'AH est impossible dans des conditions validées pour une production microbienne en bioréacteur de 3 L. En parallèle, les données de calcul des recouvrements carbonés montrent qu'ils sont très largement incomplets chez la souche 10062M9 (37 %). Des intermédiaires de synthèse, non dosés, et non associés à une synthèse d'AH, sont donc produits. De nouvelles cinétiques incluant la recherche et l'analyse de ces molécules, non représentatives d'un environnement propre à la production d'AH, permettraient d'accroître la compréhension du métabolisme de synthèse de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*.

Le mutant 10062M9 n'est donc pas retenu en accord avec les observations cinétiques rapportées.

Une production d'AH de 1,5 g/L est obtenue à partir de la souche MP1804.2 pour une production de biomasse supérieure aux essais sur la souche ATCC 39920 (2,1 g/L). Ceci se traduit naturellement par des « rendements » de production d'AH par g de biomasse bien inférieurs à la souche ATCC 39920 mise en œuvre dans les mêmes conditions de culture. Le calcul de la vitesse spécifique maximale de production d'AH montre, de plus, que les performances obtenues sont plus faibles que celles de la souche ATCC 39920 de référence. La moyenne des tailles moléculaires produite est de 0,7 kDa. La fiabilité de cette mesure est confirmée par un coefficient de polydispersité proche de 1 (Tableau 2).

La production d'AH libre chez les mutants MP0205.1 et MP0205.2 est de 2,5 g/L. Les performances de production sont ainsi améliorées de plus de 65 % par rapport au mutant MP1804.2. Les performances de production sont malgré tout légèrement inférieures à celle de la souche de référence ATCC 39920 (3,2 g/L). La production de biomasse est supérieure à celle de l'essai de référence. Les « rendements » de production d'AH par g de biomasse sont par conséquent réduits. Enfin, cette baisse de performance, en comparaison à la souche de référence ATCC, est appuyée par les données calculées des vitesses spécifiques maximales de production d'AH (0,5 et 0,6 g/g.h) respectivement pour les souches MP0205.1 et MP0205.2 et 0,97 g/g.h pour la souche ATCC de référence). Cependant, les tailles moléculaires obtenues sont bien supérieures à l'essai de référence (Tableau 2). En effet la souche ATCC produit sur milieu LAI en conditions non « optimisées » des poids moléculaires avoisinant les 2 MDa. Dans le cas des mutants MP0205.1 et MP0205.2, les tailles moléculaires atteignent 4 MDa. La pertinence de ces moyennes est appuyée par la détermination d'un coefficient de polydispersité très proche de 1 (1,2 pour 1,3 de moyenne en général pour une molécule d'AH). En comparaison à la souche ATCC (coefficient de 1,6), ces données de polydispersité, pour les mutants obtenus, dénotent d'un produit final plus facilement valorisable, technologiquement et économiquement.

Deux mutants (MP0205.1 et MP0205.2) ont des performances de « production » satisfaisantes et conformes à ce que l'on pouvait attendre. Un caractère de sélection discriminant est la latence observée chez la souche MP0205.1. Les résultats obtenus nous conduisent à conserver la souche MP0205.2 dans le cadre de la mise en œuvre d'une « cinétique bilan » dans des conditions améliorées, de milieu de culture et de mode de culture mais aussi d'aération et d'hydrodynamique.

<u>Interprétation physiologique complémentaire – considération des taux de recouvrement carboné chez des souches productrices d'AH de hautes tailles moléculaires</u>

Une information, voire un indicateur de production d'AH, en complément du rapport acétate/lactate ressort de cette batterie d'essais. Les taux de recouvrement carboné observés chez les souches MP0205.1 et MP0205.2 (75 % et 67 % respectivement) sont réduits en comparaison à la souche ATCC39220 de référence (85 %) et au mutant MP1802.2 (95 %).

Nous pouvons ainsi remarquer que, plus ce taux de recouvrement carboné est bas, plus les tailles moléculaires moyennes d'AH produit sont élevées et ce, selon une relation linéaire (R^2 = 0,96) (Figure 3).

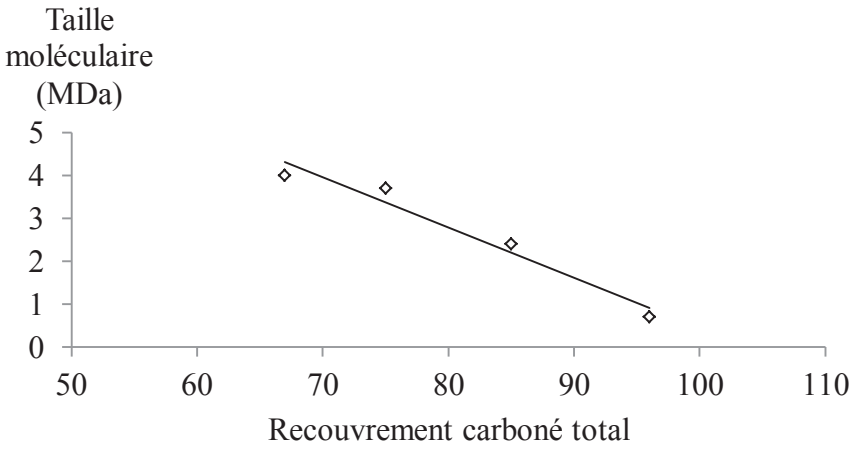


Figure 3. Droite de régression linéaire entre les recouvrements carbonés calculés et la taille moléculaire moyenne observée pour des cinétiques de culture de souches mutantes ayant présenté une production d'AH ainsi que chez la souche de référence ATCC 39920 de Streptococcus zooepidemicus *en conditions de mise en œuvre identiques.*

Un ou plusieurs autres produits non dosés sont donc synthétisés. Si l'on considère que la synthèse d'AH de grande taille pourrait être fonction de la pré-disponibilité en précurseurs de N-acétyl-glucosamine et d'acide glucuronique au niveau intracellulaire (Marcellin et al., 2014), une large accumulation de ces précurseurs au niveau intracellulaire pourrait expliquer ces observations. En effet, cette accumulation serait susceptible de modifier la masse moyenne des cellules de *Streptococcus zooepidemicus* conduisant à une modification de la pente d'association entre absorbance et concentration cellulaire au cours de la mesure de la biomasse par spectrophotométrie (valeur de la biomasse modifiée présentant un biais dans le calcul du recouvrement carboné).

D'un point de vue pratique, il serait donc envisageable de prévoir les tailles moléculaires d'AH produit, et ce, par le biais d'un simple dosage des substrats et produits carbonés dans le surnageant de culture (pas de traitement chronophage à appliquer à l'échantillon).

Ces taux de recouvrement carboné incomplets pourraient aussi s'expliquer par un impact des hyaluronidases, impliquant la dissociation des dimères de N-acétyl-glucosamine et d'acide

glucuronique au niveau du milieu de culture. Dans ce cas, l'hypothèse de corrélation directe entre recouvrement carboné, accumulation de précurseurs à la synthèse d'AH et taille moléculaire ne pourrait être confirmée. Des cinétiques de mesure des tailles moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique et détection de la diffusion de la lumière aux faibles angles ont donc été réalisées chez les souches présentant les recouvrements carbonés les plus faibles (Figure 4).

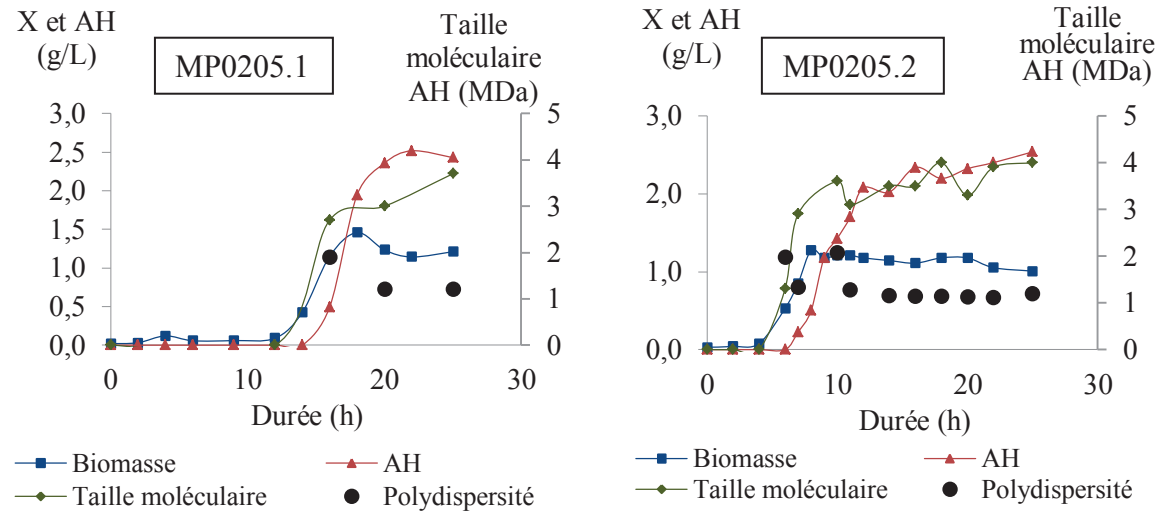


Figure 4. Cinétiques d'évolution de la taille moyenne des chaines d'acide hyaluronique en fonction du temps chez les souches mutantes MP0205.1 et MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus.

Ces courbes montrent qu'au cours de la cinétique de synthèse de l'AH les tailles moléculaires de l'exopolysaccharide ne sont pas altérées (avec des coefficients de polydispersité satisfaisants). Les oscillations observées pour la souche MP0205.2 sont probablement dues à l'erreur expérimentale (complexité de la mesure en milieu visqueux, peu homogène et concentré). Dans l'optique de confirmer notre postulat de dépendance entre recouvrement carboné, accumulation de précurseurs de la synthèse d'AH et taille moléculaire, ces études seront réitérées au cours de l'essai de synthèse suivant.

L'étude du recouvrement carboné a montré que cette donnée pouvait potentiellement servir d'indicateur de la synthèse d'AH (taille moléculaire) chez *Streptococcus zooepidemicus*. La relation linéaire existant entre recouvrement carboné et taille moléculaire permet d'envisager cet indicateur comme un moyen de criblage rapide et simple de mise en œuvre (analyses CLHP) de souches productrices d'AH de grandes tailles moléculaires.

3. Validation expérimentale des travaux d'ingénierie de souches et de développement du procédé de production d'AH

A l'issue des évaluations préliminaires de performances des mutants en conditions favorables de production, un mutant a été sélectionné pour une mise en œuvre dans les meilleures conditions identifiées au niveau des chapitres III et IV. L'objectif de cette dernière partie de la thèse consiste à faire la synthèse expérimentale des connaissances développées tout au long de ce travail pour en vérifier la pertinence et en identifier les limites et voies d'amélioration.

Nous chercherons ainsi à estimer les performances de production d'AH de la souche mutante retenue (MP0205.2) en se basant sur les informations obtenues au cours des études précédentes :

- la méthode de pré-culture normalisée sur la base de la souche ATCC 39920 sera appliquée pour cette nouvelle souche,
- le milieu PKN formulé au laboratoire servira de base nutritive,
- une CIG de 70 g/L sera préférée, et ce, sans prévision d'alimentations échelonnées,
- en ce qui concerne les conditions d'aération et d'hydrodynamique, des mobiles d'agitation pourvus de pales inclinées seront utilisés,
- de plus, une consigne de limite basse en pO_2 sera fixée à 55 % tout en maintenant une vitesse d'agitation de 600 tr/mn (partie « Résultats » - Chapitre IV – paragraphe 7).

Conditions opératoires

Durée	Volume	Milieu de culture	T	pH	pO_2	Aération/Agitation
24 h	3 L	PKN	37°C	7	55 %	0,25 à 1 vvm / 600 tr/mn

Souche mise en œuvre : MP0205.2 (mutant de souches environnementales).

Paramètres suivis : pH, pO_2, consommation de glucose, production de biomasse, d'AH, d'acide acétique et d'acide lactique. Détermination de la taille moléculaire et de la polydispersité. Mesures du potentiel d'oxydoréduction. Mesures rhéologiques.

Cette démarche tend donc à vérifier et à valider, par une mise en œuvre maîtrisée, l'effet bénéfique global de l'application des conditions positives observées au cours de chacune des

Document confidentiel

études réalisées dans ce mémoire. Il est important de noter que, dans ce cas de figure, nous ne pourrons prendre en compte les effets croisés des différents groupes de facteurs étudiés. Cette étude n'entre donc pas dans le cadre d'une planification expérimentale mais plutôt d'une validation singulière.

Performances de production

Les résultats obtenus sont synthétisés et comparés aux essais antérieurs dans le Tableau 3. Une étude comparative peut être effectuée en considérant la mise en œuvre de notre mutant surproducteur dans des conditions non « optimisées ». Il apparaît que la concentration maximale en AH libre atteinte en fin de culture est bien supérieure au témoin. Une augmentation de 56 % est constatée (3,9 g/L au lieu de 2,5 g/L). De plus, les vitesses spécifiques de production d'AH sont améliorées à raison de 100 % (0,6 et 1,22 g d'AH par g de biomasse). L'influence d'une des conditions de culture mises en œuvre ou l'effet synergique de plusieurs des paramètres optimisés au cours de cette étude ont donc un impact positif sur le facteur « concentration en AH produit ».

Tableau 3. Synthèse des principaux résultats obtenus suite à la mise en œuvre d'une souche mutante MP0205.2 de l'espèce Streptococcus zooepidemicus*. Etude comparative aux essais précédents servant de référence.*

	Conditions de culture				Résultats					
Paramètre amélioré	Souche	Milieu	[Glc] g/L	Oxygénation	[AH] $_{max}$ (g/L)	Taille molé-culaire (MDa)	$[X]_{max}$	« $Y_{AH/X}$ » (g/g)	Recouvre-ment C total (%)	πAH_{max} (g/g.h)
Système de pré-culture (référence)	ATCC 39920	LAI	50	Pales Rushton pO_2 - 10 % 400 tr/mn	3,2	2,4	1,1	2,9	85	1,37
Milieu de culture	ATCC 39920	PKN	50	Pales Rushton pO_2 - 10 % 400 tr/mn	3,1	1,9	1,5	2,1	95	0,99
Alimentation en glucose	ATCC 39920	PKN	70	Pales Rushton pO_2 - 10 % 400 tr/mn	4,3	1,8	1,7	2,5	106	0,78
Oxygénation	ATCC 39920	LAI	50	Pales Inclinées pO_2 - 50 % 400 tr/mn	4,1	2,5	1,2	3,4	93	1,40
Ingénierie de souche	MP0205.2	LAI	50	Pales Rushton pO_2 - 10 % 400 tr/mn	2,5	4,0	1,3	1,9	67	0,6
ESSAI FINAL	MP0205.2	PKN	70	Pales Inclinées pO_2 - 55 % 400 tr/mn	3,9	3,1	1,5	2,6	86	1,22

Document confidentiel

Les molécules d'AH produites sont néanmoins de plus petite taille moléculaire. Une diminution de l'ordre de 20 % est observée ; ceci conduit à s'interroger sur une production d'AH qui ne serait pas, ou pas uniquement, souche dépendante mais possiblement influencée par l'oxygénation (dégradation des molécules d'AH) ou par un effet couplé de plusieurs facteurs. Malgré cette diminution, ces résultats soulignent les performances de production de la souche sélectionnée puisque les tailles moléculaires se situent toujours dans une gamme supérieure au témoin ATCC 39920 de référence (2,4 MDa).

Jusque-là, les meilleures performances de production d'AH chez une souche ATCC de référence, si l'on considère la taille moléculaire et la concentration, ont été obtenues au cours de l'étude concernant « l'effet de l'oxygène sur la production d'AH » (partie « Résultats » - Chapitre IV – paragraphe 7). A partir de cette souche témoin (ATCC 39920) une concentration maximale de 4,1 g/L avait été atteinte pour une répartition moyenne des tailles de 2,5 MDa (Tableau 3). En comparaison, la production de 3,9 g/L d'AH pour une répartition moyenne des tailles de 3,1 MDa devrait permettre d'améliorer de manière non négligeable la viscosité apparente du milieu. Une mesure de la viscosité dynamique en fonction du taux de cisaillement a été effectuée (Figure 5). Il apparaît, en comparaison à la souche ATCC 39920, qu'à taux de cisaillement négligeable (proche de 0,01 s^{-1}), la viscosité dynamique mesurée en fin de culture bactérienne est améliorée d'un facteur supérieur à 2 (10,6 Pa.s pour 3,8 Pa.s). Ces valeurs montrent l'influence majeure de la taille moléculaire par rapport à la concentration sur la viscosité finale de l'AH en solution. Une « meilleure conformation » des molécules dans le cadre de la production d'AH à partir de la souche MP0205.2 pourrait de même expliquer, en partie, ces résultats.

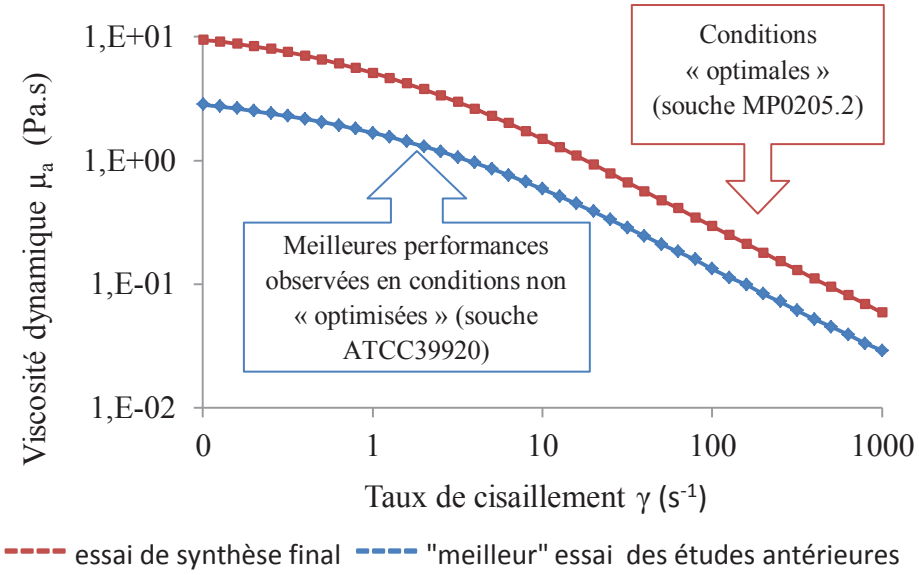


Figure 5. Evolution de la viscosité dynamique mesurée par rhéomètrie en fonction du taux de cisaillement Comparaison entre l'essai bilan de la présente étude est l'essai ayant abouti aux meilleurs rendements de production d'AH lors des études précédentes.

Par comparaison à une souche de référence surproductrice d'AH dans des conditions de culture de « référence », une application, sans considération des effets croisés, de différents facteurs abiotiques améliorés, sur la mise en œuvre d'une souche surproductrice obtenue par mutagénèse aléatoire, permet :

- d'améliorer la concentration maximale en AH libre remis en suspension dans le milieu de culture de **20 %,**
- d'augmenter la répartition moyenne des tailles moléculaires d'AH produit de **30 %**,
- d'accroître la viscosité dynamique du milieu de culture de plus de **170 %.**

Remarque : cette viscosité dynamique mesurée prend en compte la concentration en AH produit et les tailles moléculaires produites. Néanmoins, ces valeurs sont à considérer comme une approximation puisque la viscosité mesurée dépendra aussi de la conformation des molécules d'AH entre elles et donc de la composition du milieu de culture, notamment la salinité.

Interprétation cinétique et physiologique - Identification des facteurs limitants

Au cours des études précédentes, des caractéristiques macroscopiques propres à des souches surproductrices ont pu clairement être identifiées :

- colonies imperceptibles entourées d'une matrice translucide et visqueuse,
- viscosité apparente du milieu de culture en cours de fermentation (difficultés à culoter la matrice cellulaire – capsule d'AH).

Des caractéristiques plus spécifiques et relatives au métabolisme de souches de *Streptococcus zooepidemicus* surproductrices d'AH ont de même été observées et listées :

- action des hyaluronidases non limitante au niveau de la concentration et de la taille des molécules d'AH produites (maintien de la taille et de la concentration, au cours du temps, constaté au cours de l'essai de sélection d'une souche mutante – étude préliminaire de sélection décrite dans le présent chapitre),
- métabolisme primaire en présence d'oxygène avec oxydation catabolique du glucose et formation de co-produits issus de la glycolyse – rapport acétate sur lactate proche de 0,1,
- un lien entre recouvrement carboné et taille moléculaire,
- un environnement plutôt oxydant favoriserait la production d'AH.

Action des hyaluronidases

Des mesures, par chromatographie d'exclusion stérique et détection de la diffusion de la lumière aux faibles angles, ont été réalisées afin de mettre en évidence l'action potentielle de hyaluronidases bactériennes au cours du temps (Figure 6).

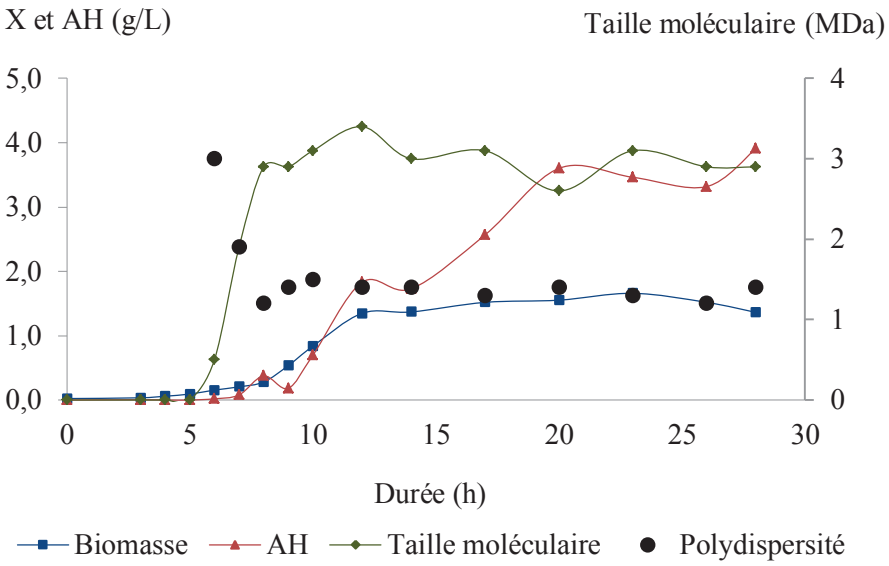


Figure 6. Cinétique de production d'AH et de biomasse et évolution de la taille moléculaire de l'AH en fonction du temps.

Comme pour les essais précédents, nous pouvons constater :

- que la taille moléculaire maximale atteinte n'est pas affectée en cours de culture (sur la période observée) et que,
- cette taille maximale est atteinte même à faible concentration en AH libre dans le milieu.

Au vu de ces résultats, une analyse complémentaire de l'activité hyaluronidasique sur gélose n'a pas été nécessaire. De plus, les données concernant le coefficient de polydispersité pour les mesures de taille moléculaire réalisées nous permettent de valider la représentativité des moyennes calculées et ce, dès 8 h de culture (coefficient égal ou supérieur à 2 à très faibles concentrations en AH puis stabilisation de la valeur autour de 1,3).

Une action de hyaluronidases sur la dégradation de la molécule d'AH peut ici être exclue puisqu'en complément du maintien de la taille moléculaire (faible polydispersité), la production d'AH au cours du temps est poursuivie.

Il est convenu, dans la littérature, et ce, depuis de nombreuses années, qu'au même titre que la capsule d'AH (pathogénicité anti-phagocytaire), la production de hyaluronidases chez les Streptocoques tel *Streptococcus zooepidemicus,* joue un rôle de facteur de virulence. Ces enzymes seraient en effet, dans une phase tardive, impliquées dans la propagation de

l'organisme à partir de son site initial d'infection en décomposant l'acide hyaluronique présent dans les tissus de l'hôte. Néanmoins, les mécanismes de régulation des gènes impliqués dans la synthèse des hyaluronidases bactériennes sont mal connus. En effet, comment l'organisme bactérien tend à réguler deux activités fondamentalement opposées de production d'AH et de dégradation de cette molécule ? Tous les résultats relatifs à ces aspects et abordés dans ce travail conduisent à conclure que les souches productrices et non productrices d'AH ne seraient pas dans la capacité de produire de hyaluronidases. L'hypothèse que ces deux activités ainsi que leurs systèmes de régulation pourraient être dissociés ne peut donc être avancée sans résultat complémentaire. Une inhibition de l'activité hyaluronidasique en lien avec une des conditions de mise en œuvre appliquée pourrait éventuellement être soulevée.

Métabolisme et rapport acétate / lactate

Au cours de cet essai de « synthèse », un suivi de l'activité métabolique a été réalisé par dosage en CLHP du substrat glucose et des produits du métabolisme central de la souche mutante de *Streptococcus zooepidemicus*. L'objectif était de vérifier qu'il existe bien un profil hétérolactique type chez des souches surproductrices d'AH qui se traduirait par une orientation majoritaire des flux métaboliques vers la production de lactate. Les cinétiques sont présentées dans la Figure 7.

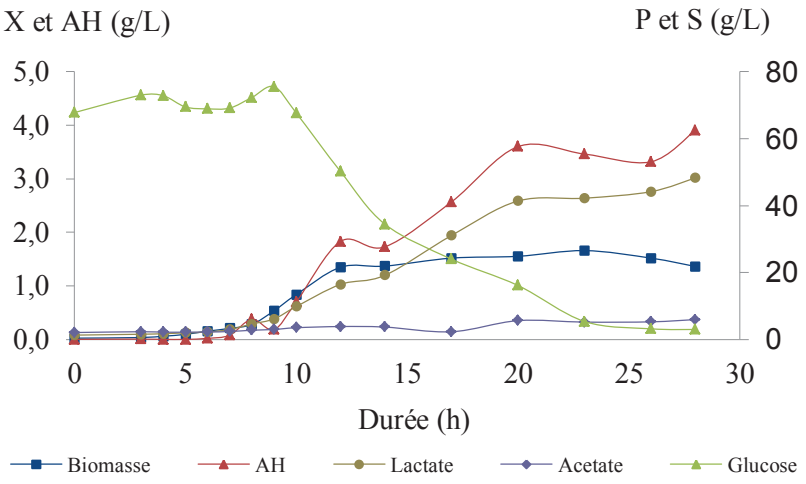


Figure 7. Cinétiques en bioréacteurs Applikon (3 L, pH régulé, consigne pO_2 de 55 %, 70 g/L de glucose) - Souche MP0205.2 – milieu PKN.

En définitive, près de 50 g/L de lactate sont produits pour environ 5 g/L d'acétate formés.

Un ratio acétate / lactate proche de 0,1 est donc retrouvé (0,11 g/g). Ces données confirment bien les tendances observées jusqu'ici. L'utilisation d'un tel indicateur dans des étapes de criblage de souches, ou dans des étapes annexes d'amélioration du système de production, peut être envisagée.

Corrélation entre taux de recouvrement carboné et taille moléculaire

Au cours de l'étape précédente pour la sélection d'un mutant d'intérêt, il avait été noté :

- qu'un recouvrement carboné incomplet était représentatif d'un métabolisme de production d'AH de hautes tailles moléculaires,
- qu'il existait une relation linéaire ($R^2 = 0,96$) entre le recouvrement carboné calculé et les tailles moléculaires produites et ce dans des conditions de culture identiques (référence).

Au regard des résultats synthétisés dans le Tableau 3 (synthèse des principaux résultats du chapitre IV comparés à cet essai « bilan »), il semblerait une nouvelle fois qu'une tendance irait dans ce sens, et ce, quelles que soient les conditions de culture appliquées ou la souche mise en œuvre (ATCC 39920 ou mutant MP0205.2). En effet, plus les recouvrements carbonés sont bas (orientation des flux métaboliques vers la synthèse de précurseurs à la production d'AH ?) plus la taille moléculaire d'AH produit est élevée. Cette relation a été évaluée par tracé de la courbe de corrélation entre taux de recouvrement carboné et taille moléculaire (Figure 8). Un coefficient de corrélation de 0,71 est observé.

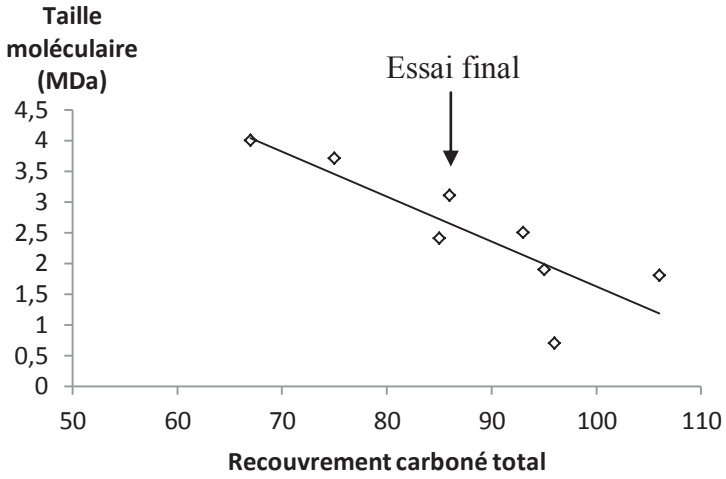


Figure 8. Droite de régression linéaire entre les recouvrements carbonés calculés et la taille moléculaire observée pour des cinétiques de culture de souches de ATCC 39920 et MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus en conditions de mise en œuvre différentes.

La production d'AH de haut poids moléculaire est donc très probablement dépendante de la disponibilité en précurseurs de la synthèse d'AH (Marcellin et al., 2014). Cette accumulation se retrouve traduite de manière assez fidèle par la considération des recouvrements carbonés. D'un point de vue pratique la définition de ce critère en complément du rapport acétate sur lactate peut s'intégrer dans des étapes aval de criblage de nouvelles souches productrices d'AH de grande taille moléculaire ou encore dans le cadre d'étapes complémentaires de formulation de nouveaux milieux de culture.

La mise en place d'un modèle de prédiction des tailles moléculaires par des mesures simples et applicables en cours de culture microbienne nécessitera néanmoins la multiplication de nouveaux essais dans des conditions de culture variées ainsi que par la mise en œuvre de souches différentes de *Streptococcus zooepidemicus*.

Une redirection des flux métaboliques est constatée et ces flux se sont très probablement redirigés vers la synthèse au niveau intracellulaire d'une importante quantité (14 % du carbone issu du glucose) de précurseurs de l'AH (Figure 9). Malgré cela, comment expliquer ce phénomène ? Quelles conditions mises en œuvre favoriseraient l'accumulation de précurseurs à la synthèse d'AH ?

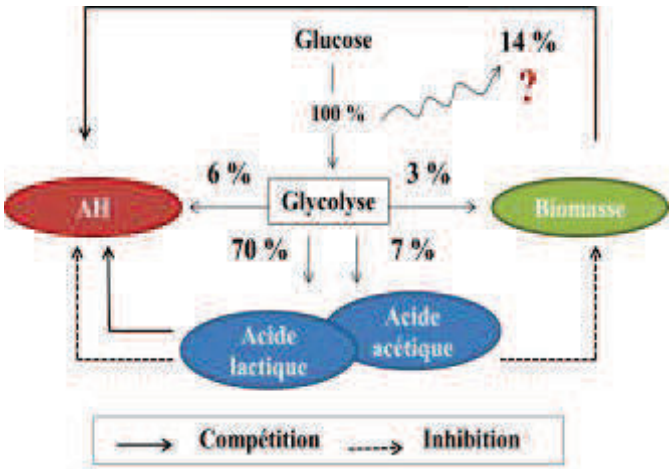


Figure 9. Résultats schématiques des recouvrements carbonés observés au cours de la cinétique bilan mise en œuvre en bioréacteur de 3 L à partir de la souche MP0205.2.

Une comparaison de l'essai de référence (ligne 1 du Tableau 3) avec un essai dans des conditions de mise en œuvre identiques à l'exception du modèle biologique (souche mutante MP0205.2, ligne 5 du (Tableau 3) montre qu'un effet souche est dans ce cas clairement identifiable. Néanmoins, la synthèse d'AH (tailles moléculaires) ne serait pas uniquement souche dépendante puisqu'au cours de deux derniers essais (même souche mutante MP0205.2) des tailles de 4 MDa et 3,1 MDa ont été produites (

Tableau 3). En plus des conditions d'oxygénation et de la CIG dont les influences, sur la taille moléculaire, n'ont pu être démontrées sur la taille moléculaire, un milieu de culture différent a été utilisé. Au cours des essais de constitution / adaptation du milieu de culture, il a été démontré que l'utilisation du milieu PKN (CIG 70 g/L) avec la souche ATCC 39920 (ligne 3 du Tableau 3) en comparaison à l'essai de référence (milieu LAI, CIG à 50 g/L) permettait d'observer une amélioration de la concentration maximale en AH produit, de l'ordre de 43 %, mais impliquait une diminution de la taille moléculaire de l'ordre de 20 %. En raison de l'erreur liée au prélèvement, au traitement et à l'analyse des échantillons (étalonnage + mesure), cette diminution ne nous apparaissait pas forcément comme significative. Toutefois, ce postulat pourrait ainsi être reconsidéré.

Si nous comparons les milieux de cultures LAI et PKN, une explication simple pourrait se retrouver dans l'addition dans le milieu PKN de glutamine qui est un précurseur direct de la synthèse d'AH puisqu'il intervient dans la formation d'une de ses sous-unités (N-acétyl-glucosamine). Ceci mettrait en avant un complément d'information quant au métabolisme de synthèse de l'AH. En effet, un ajout en glutamine serait susceptible de créer un déséquilibre

entre synthèse de N-acétyl-glucosamine et synthèse d'acide glucuronique ce qui favoriserait la production finale en AH d'un point de vue quantitatif mais serait un frein à la formation d'AH de grande taille moléculaire. Ceci pourrait signifier qu'il existe, au cours de la synthèse, un effet cinétique contrôlable entre production et remise en suspension de la molécule par l'AH synthétase et que celui-ci serait dépendant, en partie, de l'équilibre de synthèse entre l'acide glucuronique et la N-acétyl-glucosamine.

Effet de l'oxygène sur la synthèse d'AH

Un ultime indicateur, mesurable en ligne au cours de la culture microbienne, peut être mis en avant. En effet, l'influence de l'oxygénation, et donc du potentiel rédox au sein du milieu de culture, a été mise en relief au cours des études précédentes.

La Figure 10 montre qu'une mesure rédox de faible amplitude est retrouvée (entre 150 et 200 mV) pour une « valeur plancher » comprise entre -150 et -200 mV. Aucune limitation en oxygène n'est de plus constatée, confirmant ainsi l'importance de maintenir un environnement oxydant tout au long du processus de synthèse de l'AH. Enfin, il apparaît qu'à la « stabilisation » de la production d'AH (20 h), les valeurs de pO_2 et de potentiel rédox tendent à revenir à leur niveau initial. Ceci confirme l'éventualité de pouvoir utiliser ces variables comme moyen de pilotage des cultures microbiennes dans le cadre de la production d'AH à plus grande échelle chez *Streptococcus zooepidemicus*.

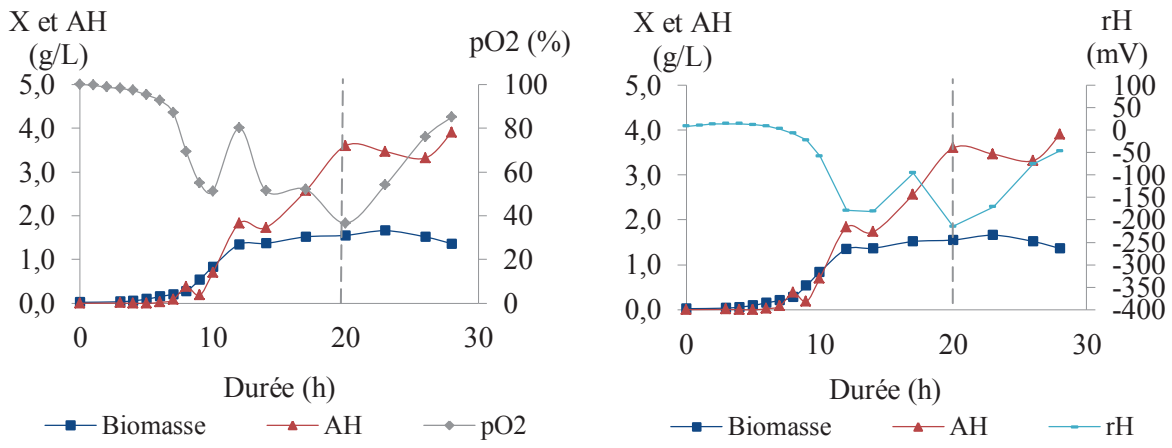


Figure 10. Evolution de la pO_2 et du potentiel redox ainsi que de la production de biomasse et d'AH en fonction du temps.

Document confidentiel

En complément, des mesures rhéologiques ont été effectuées tout au long de la cinétique de production de l'AH afin de statuer sur l'évolution du transfert d'oxygène (calcul théorique détaillé dans la partie I – « Etude Bibliographique »). Le Tableau 4 et la Figure 11 montrent :

- qu'il y a une augmentation logique de la viscosité dynamique au cours du temps (de 1,4 Pa.s jusqu'à 12,5 Pa.s) et ce en parallèle de la production d'AH. Cette augmentation de la viscosité couplée à des observations effectuées en cours de culture, nous permettent de soulever une problématique importante liée au mélange et à l'homogénéité du milieu (formation d'une cavité en cœur de cuve). Ces aspects devront, à plus grande échelle, être amplement considérés.
- que le transfert d'oxygène diminue suite à cette augmentation mais se maintient à un niveau, selon toute vraisemblance, favorable à la reproduction d'un environnement oxydant à l'interface cellule / milieu. L'influence positive du taux d'oxygénation en lien direct avec le potentiel d'oxydo-réduction retrouvé dans le milieu de culture est donc une nouvelle fois mise en avant.

Tableau 4. Synthèse des mesures rhéologiques de viscosité dynamique effectuées et des calculs de transfert d'oxygène qui en résultent.

Temps (h)	Viscosité dynamique(Pa.s) à taux de cisaillement = 0,1 s^{-1}	Cisaillement moyen (s^{-1})	Viscosité dynamique associée (Pa.s)	P_0 (puissance dissipée en réacteur non aéré en $kg.m^2.s^{-3}$)	P_g (puissance dissipée en réacteur aéré en $kg.m^2.s^{-3}$)	K_La (h^{-1})
t8	1,40	200	$2,50.10^{-02}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	63
t9	3,46	200	$4,30.10^{-02}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	51
t10	3,92	200	$7,20.10^{-02}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	42
t11	4,95	200	$1,15.10^{-01}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	34
t12	11,8	200	$1,57.10^{-01}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	30
t13	11,3	200	$1,82.10^{-01}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	29
t14	12,5	200	$1,91.10^{-01}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	28
t15	10,6	200	$1,79.10^{-01}$	1,6	$1,92.10^{-01}$	29

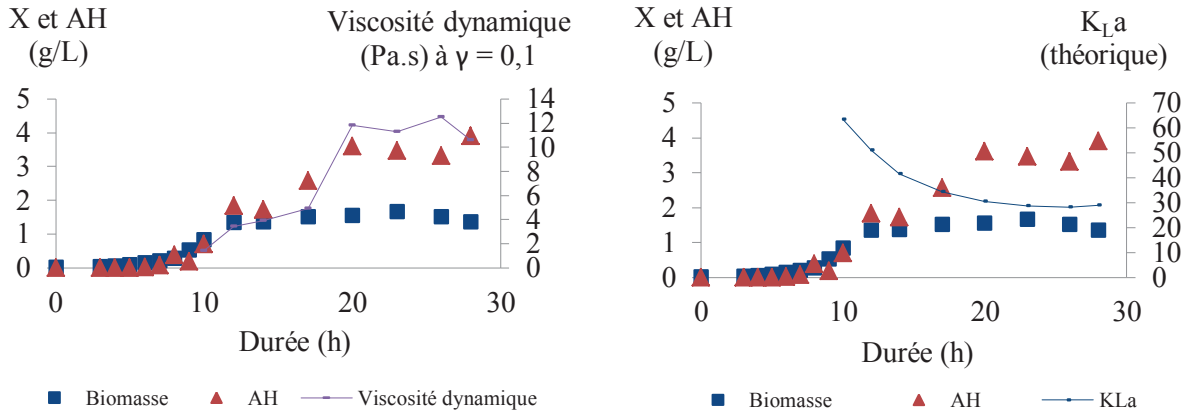


Figure 11. Evolution de la viscosité dynamique (à gauche) et du coefficient de transfert d'oxygène (à droite) en fonction du temps au cours de cinétiques effectuées chez la souche MP0205.2 de Streptococcus zooepidemicus.

La mise en évidence, au cours de ces travaux, de telles observations relatives à l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction au cours de la synthèse d'AH, permet d'envisager, d'une part, une utilisation de ce paramètre pour une extrapolation du procédé à l'échelle pilote (paramètre extrapolable complémentaire à d'autres facteurs associés tel le transfert d'oxygène). D'autre part, un tel paramètre pourrait être employé pour le suivi, voire le pilotage, du procédé de production d'AH à plus grande échelle (contrôle dynamique de l'agitation et de l'aération ou utilisation par exemple en tant qu'indicateur d'arrêt de la production d'AH).

4. Conclusion

La démarche imposée dans le temps de développement en parallèle des étapes de recherche de souches plus productrices et d'un procédé de production d'AH a pu être mise en place. Des performances de production très intéressantes ont pu être obtenues chez le mutant MP0205.2 sélectionné (par rapport à une souche aux performances reconnues comme l'ATCC). Une amélioration de la concentration et de la taille moléculaire a été obtenue sur la base de paramètres de culture bien définis. Cette ultime étude valide une première ébauche solide du procédé de production en développement reposant sur de solides acquis. Différents aspects technologiques sont donc validés suite à cet essai :

- la souche retenue pour une exploitation industrielle (MP0205.2). Ce mutant est disponible en stock et ses performances élevées tant en niveau de production qu'en

taille d'AH sont stables. Néanmoins un complément dans l'étape de développement des souches devra être apporté afin d'éliminer le caractère hémolytique chez cette souche,

- le suivi et la mise en œuvre des pré-cultures avec la standardisation d'un mode de pré-culture fiable,
- la formulation d'un milieu de culture de nature semi-définie et de composition riche minimisant les limitations au cours du processus de synthèse de l'AH (dans les conditions expérimentales choisies) et ne donnant pas lieu à l'apparition d'une activité hyaluronidasique,
- la confirmation et la définition de conditions physico-chimiques spécifiques à la synthèse d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus* avec un mode de mise en œuvre facile d'extrapolation (cultures discontinues réalisées en moins de 24 h).

Plus spécifiquement, l'étude réalisée et présentée dans ce chapitre permet la validation ou la définition de différents paramètres et indicateurs clés relatifs à la production d'AH qui assureront :

- la possibilité de conduire des études, en aval, de criblage et de précision de conditions améliorées de culture (formulation du milieu de culture par exemple) en mettant à profit des indicateurs macroscopiques (aspect des colonies sur gélose, viscosité du milieu de culture) et métaboliques (rapport acétate / lactate et recouvrements carbonés),
- la possibilité d'une extrapolation à plus grande échelle et d'un contrôle affiné du procédé via la mesure du potentiel d'oxydo-réduction, qui pourrait être complémenté par l'emploi d'un paramètre extrapolable clé tel le transfert d'oxygène sous réserve de préciser nos résultats (études sur le mélange et l'homogénéité).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Document confidentiel

Conclusion générale

La problématique générale à l'origine de cette étude était : « Quels moyens cognitifs et techniques devaient être développés dans le but de comprendre, de mettre en œuvre et d'améliorer, en taille et en concentration, la production in vitro (bioréacteur) d'acide hyaluronique, chez une souche de *Streptococcus zooepidemicus* naturellement retrouvée sur des sites infectieux chez les animaux ? ». Le choix a été fait de partir d'une batterie de souches dites « environnementales » de *Streptococcus zooepidemicus* dont les performances de production étaient à définir. Ainsi, nous nous sommes fixés quatre objectifs principaux :

- amélioration de nos connaissances théoriques sur le sujet de par une étude bibliographique étendue avec identification de points critiques dans la littérature quant à la production d'AH, sur divers systèmes de production, à partir de souches de *Streptococcus zooepidemicus*,
- définition voire développement d'un ensemble de méthodes analytiques pour la mise en place d'un suivi dynamique complet du métabolisme de production de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*,
- criblage des performances de production des souches « environnementales » à disposition avec la possibilité d'y intégrer une étape de mutagénèse aléatoire dans le cas ou les capacités de production relevées étaient insuffisantes, et en parallèle,
- amélioration du procédé de production à l'échelle du bioréacteur de laboratoire sur la base de facteurs clés identifiés au cours de l'étude bibliographique.

Les principaux résultats du travail exposé dans ce mémoire, en relation avec les objectifs préalablement énoncés, sont décrits en détail ci-dessous et sont présentés de manière synthétique dans la figure 1.

Etude bibliographique étendue.

Une étude bibliographique a été réalisée. Elle aura permis de mettre en avant certains verrous techniques (analytique) mais aussi scientifiques (performances des souches, milieu de culture, mode de mise en œuvre) dans le cadre du développement d'un procédé de production d'AH microbien.

Définition ou développement de méthodes analytiques pour permettre un suivi et une meilleure compréhension du métabolisme de production de l'AH chez *Streptococcus zooepidemicus*.

L'étude bibliographique préliminaire a fait ressortir la nécessité de mettre au point des méthodes analytiques appropriées au contexte de l'étude. Nous avons ainsi proposé une méthodologie simple, rapide et précise de quantification de la biomasse permettant de se dispenser de toute interférence liée au milieu de culture avec une mesure effectuée dans un tampon spécifique. Les résultats obtenus permettent, de plus, d'effectuer une quantification de la biomasse (en g/L) qui serait uniquement imputable à la fraction cellulaire dépourvue d'une éventuelle gaine d'AH, et ce, à partir d'une simple mesure spectrophotomètrique.

Une méthode efficace et rapide de révélation de l'activité hyaluronidasique a, de plus, été mise en place. Cette méthode très simplifiée, si l'on s'en réfère aux données existantes, favorise un suivi de cette activité chez *Streptococcus zooepidemicus* au cours de cinétiques microbiennes (très faibles volumes nécessaires).
Par ailleurs, un ensemble d'autres moyens analytiques, pour une meilleure compréhension des phénomènes métaboliques intervenant au cours de la synthèse de l'AH, a été mis en place assurant ainsi le bon suivi des performances de production chez *Streptococcus zooepidemicus*.

Etude métabolique sur la synthèse d'AH chez des souches « environnementales » potentiellement productrices et mise en œuvre d'un moyen d'amélioration de leurs performances sur la base d'une ingénierie de souche (mutagénèse aléatoire).

Rapidement, la production d'AH à partir des souches environnementales dont nous disposions (souches issues de sites infectieux chez le cheval et pouvant faire l'objet d'une mise en œuvre à plus grande échelle) a représenté un point sensible. Cette constatation a fait suite à des essais réalisés en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteurs de laboratoire nous conduisant à repenser deux aspects essentiels : les conditions de mise en œuvre mais aussi, et surtout, les performances naturelles de production d'AH de nos souches de *Streptococcus zooepidemicus*. Un mode opératoire de mutagénèse aléatoire a tout d'abord été défini pour être, ensuite, appliqué aux différentes souches disponibles. Un mutant non hémolytique et stable sur plusieurs générations a pu être obtenu dans un premier temps. Par la suite, des essais « en masse » ont été réalisés en appliquant le protocole sélectionné à un mélange de l'ensemble des souches environnementales à disposition. Dans les conditions expérimentales

mises en jeu, 26 000 mutants ont été obtenus. Sur cet ensemble, seulement quatre mutants présentaient un phénotype de colonie ponctiforme, quasiment imperceptible, entourée d'une large matrice externe visqueuse et translucide. Ces résultats ont permis de valider le protocole opératoire défini pour des souches encapsulées de *Streptococcus zooepidemicus* et ont de plus permis de mettre en avant l'existence d'un moyen (indicateur macroscopique) de criblage rapide de souches surproductrices d'AH.

Amélioration du procédé de production à l'échelle du bioréacteur de laboratoire sur la base de facteurs clés, identifiés au cours de l'étude bibliographique.

En premier lieu, un milieu de culture qui ne précipite pas et qui répond aux exigences physiologiques de *Streptococcus zooepidemicus* a pu être formulé (milieu PKN). L'importance de l'apport en glucose et en matières azotées telles que des peptones, des extraits de levure, ou encore de la glutamine (précurseur de la synthèse d'AH) a été relevée. De plus, l'influence du rapport glucose / sources azotées a été mise en évidence (premières productions d'AH). Enfin, le rôle clé de l'environnement oxydo-réductif et énergétique dans le cadre de la synthèse d'AH chez *Streptococcus zooepidemicus* a été souligné au cours de cette étude. Sur la base de ces essais de « formulation d'un milieu de culture » en fioles d'Erlenmeyer, une production d'AH de l'ordre de 0,5 g/L a pu être constatée.

Une étude plus précise des conditions de culture a ensuite été réalisée. L'objectif ici était de formuler un milieu de composition voisine de celle de l'environnement de production d'AH rencontré par les cellules de *Streptococcus zooepidemicus* in vivo. Ainsi, des productions d'AH allant jusqu'à 4 g/L environ pour des tailles moléculaires très satisfaisantes de l'ordre de 2 MDa ont pu être obtenues sur la base de différents paramètres étudiés :

- amélioration des conditions de pré-culture (état physiologique adéquat),
- étude du mode d'alimentation en glucose (faible effet positif des alimentations échelonnées sur la production d'AH non justifié, en comparaison à un mode discontinu, si l'on considère les rendements de conversion du glucose en AH),
- étude des conditions d'oxygénation (production d'AH améliorée dans des conditions « non limitantes » en oxygène avec un maintien de l'activité métabolique après épuisement du glucose, mise en exergue de la mesure potentiel rédox en tant qu'indicateur clé).

L'application de ces conditions à un de nos mutants potentiellement surproducteurs a permis de maintenir ces performances de production en considération de la concentration en AH finale et d'améliorer la production d'un point de vue de la taille moléculaire de 50 % à 100 %

(3 à 4 MDa). De plus, ces essais ont permis de répondre à des problématiques annexes. En effet, l'impact des hyaluronidases sur les tailles des molécules d'AH produits n'a pu être démontré dans les différentes conditions mises en œuvre. Enfin, le mode d'alimentation et la quantité de substrat « glucose » apportée n'ont pas d'effet notoire sur la taille moléculaire de l'AH. Néanmoins, une dépendance taille d'AH / souche a été démontrée. De plus, il a été démontré qu'une influence de la composition du milieu de culture sur la balance de production de chacun des précurseurs de l'AH, et donc sur la taille, pourrait exister.

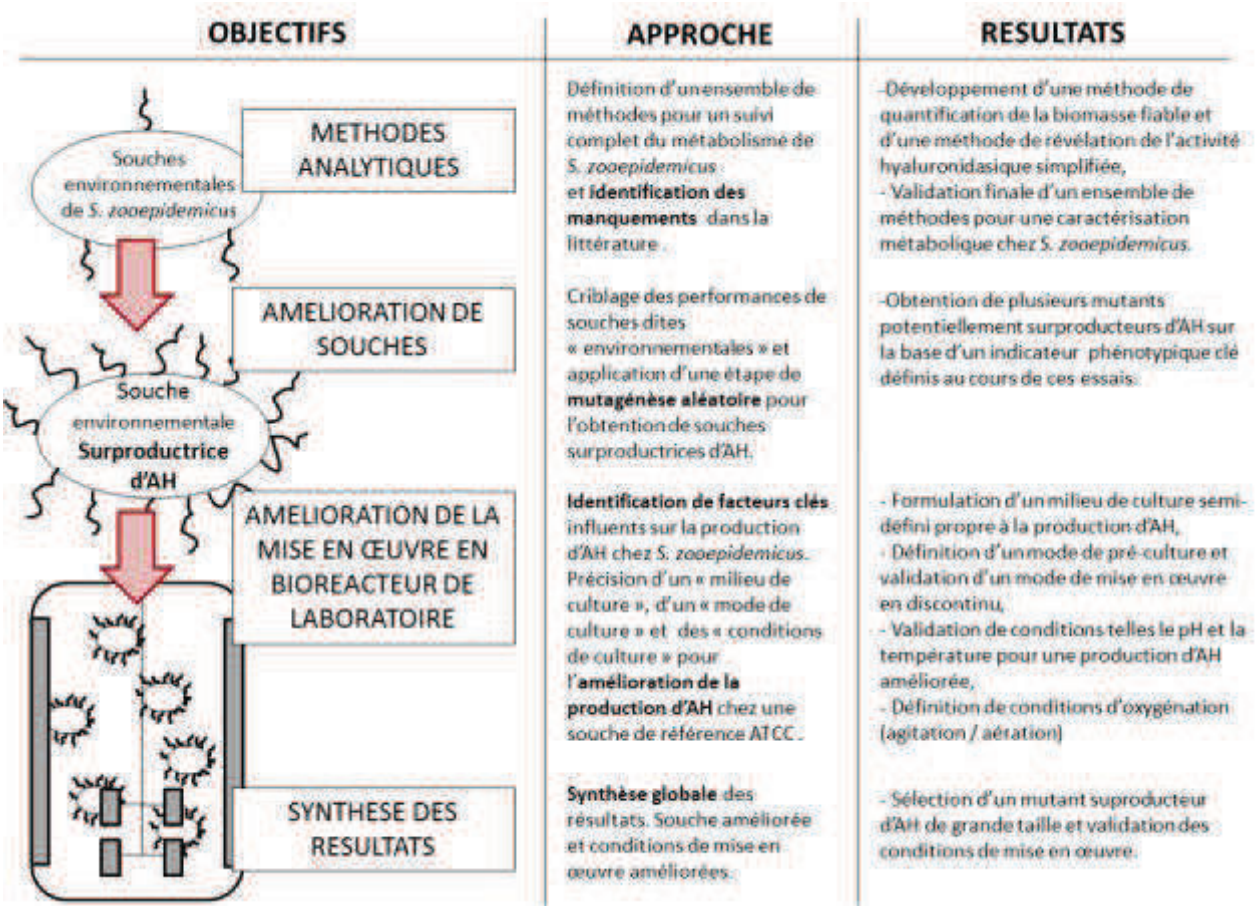


Figure 1. Conclusion synthétique des différents résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse sur la base de la démarche initialement définie pour une amélioration de la production d'AH en bioréacteur chez une souche de Streptococccus zooepidemicus.

Perspectives

Les études présentées dans ce mémoire valident une première ébauche d'un procédé de production d'AH par voie microbienne. La définition d'un tel procédé repose sur des connaissances nouvelles acquises ou confirmées au cours de ce travail. Plusieurs voies d'amélioration des conditions définies peuvent néanmoins être soulignées.

Ingénierie de souche

Sur la base de l'indicateur phénotypique défini (colonies quasiment imperceptibles entourées d'un large halo de matrice translucide), de nouvelles campagnes de mutagénèse aléatoire peuvent être aisément envisagées. D'une part, dans l'optique d'obtenir un panel de souches suproductrices de différentes tailles d'AH en fonction des applications envisagées (production souche-dépendante). L'éventualité d'une conduite de ces études en aval de criblage pourra se faire en mettant à profit des indicateurs métaboliques tel le rapport acétate / lactate (proche de 0,1 chez des souches surproductrices), la production spécifique AH/X (supérieure à 1) ou encore les taux de recouvrements carbonés (potentiellement représentatifs des tailles moléculaires d'AH produites). D'autre part, dans le but d'obtenir des mutants ayant perdu leur capacité d'hémolyse. Ceci nous permettrait d'envisager, dans la pratique, une exploitation (manipulations) à plus grande échelle plus simple et plus sûre de ces mutants (sécurisation de la production). Une autre approche, dans le cadre d'une possibilité d'exploitation des souches mutées déjà à disposition, sera d'identifier les résistances de ces bactéries en disposant d'antibiogrammes complets.

Milieu de culture

Une voie d'amélioration du milieu de culture a été envisagée à l'entame de cette thèse mais n'a néanmoins pu faire l'objet d'une étude complète. Partant du principe que l'AH est retrouvé au niveau de l'épiderme en complément d'autres acides gras essentiels (acides linoléniques par exemple), une piste d'amélioration aurait consisté en l'emploi de ces acides gras à titre de substrat énergétique dans l'optique de reconstituer, éventuellement, un environnement propre à la production d'AH.

Mode de culture

L'hypothèse de l'existence d'un effet seuil (glucose) à 30 g/L a pu être soulevée dans le cadre de la production d'AH en bioréacteur. En effet, une diminution des performances de production en deçà de cette concentration résiduelle a été constatée. Même si une reprise de la production d'AH à 15 g/L de glucose résiduel ne nous a pas permis de valider cette hypothèse, il serait souhaitable de réaliser sur la même base d'étude, un essai d'alimentations échelonnées de manière mieux contrôlée, et ce, assistée par des analyses en chromatographie liquide haute performance (CLHP) en direct. Dans l'idéal des cultures en discontinu alimenté peuvent aussi être envisagées (maintien constant à des vitesses spécifiques de croissance optimales pour une amélioration de la production d'AH).

Document confidentiel

Conditions de culture

L'effet de l'oxygénation sur la production d'AH devra être étudié de manière plus approfondie en envisageant de travailler dans des conditions plus extrêmes de transfert d'oxygène (agitation). D'un point de vue plus fondamental, en amont, une étude de physiologie cellulaire pourrait être mise en place au moyen d'analyses métabolomiques des différentes oxydases et enzymes impliquées dans la régulation du potentiel rédox (variation du taux d'expression en fonction du temps, de l'environnement ou de l'état physiologique des bactéries) et éventuellement des enzymes impliquées dans le métabolisme du soufre pour l'identification d'éventuelles limitations en oxygène au cours du procédé. Ces analyses pourront de même être appliquées à une étude plus avancée et plus précise de l'expression des AH synthétases (voire en amont des enzymes responsables du maintien de l'équilibre de ses précurseurs) et des hyaluronidases au cours de la production d'AH ; ceci dans le but de déterminer si ces productions sont associées (avec une inhibition de l'activité hyaluronidasique qui serait donc inhérente aux conditions de culture) ou dissociées (pas de production de hyaluronidases au cours de la synthèse d'AH). Enfin, des études hydrodynamiques pourraient permettre d'étudier plus précisément l'évolution entre viscosité dynamique, homogénéité, mélange et donc transfert d'oxygène.

Extrapolation à l'échelle pilote

Pour conclure, les informations cumulées au cours de cette thèse (facteurs limitants, paramètres majeurs à prendre en compte, estimateurs du bon déroulement de la culture et leviers macroscopiques à mettre en œuvre pour maintenir les performances) peuvent nous permettre d'envisager une extrapolation du procédé de production d'AH microbien à une plus grande échelle (échelle pilote).

REFERENCES

- Références bibliographiques -

A Abdalla S, Makhoul G, Duong M, Chiu RCJ and Cecere R (2013) Hyaluronic acid-based hydrogel induces neovascularization and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction 17: 767-772

Armstrong DC, Johns MR (1997) Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied and Environmental Microbiology 63:2759-2764

B Baker JR, Pritchard DG (2000) Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. Biochemical Journal 348:465-471

Bake JR, Dong S, Pritchard DG (2002) The hyaluronan lyase of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. Biochemical Journal 365:317-322

Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW (1986) Nomenclature of hyaluronic acid. Biochemical Journal, 235, 903

Benchetrit LC, Gray ED, Wannamaker LW (1977) Hyaluronidase activity of bacteriophages of group A streptococci. Infection and Immunity 15:527-532

Bian XH et al. (2014) The Role of CD44-Hyaluronic Acid Interaction in Exogenous Mesenchymal Stem Cells Homing to Rat Remnant Kidney. Kidney and Blood Pressure Research 38:11-20.

Blank LM, McLaughlin RL, Nielsen LK (2005) Stable production of hyaluronic acid in *Streptococcus zooepidemicus* chemostats operated at high dilution rate. Biotechnology and Bioengineering 90:685-693

C Chen SJ, Chen JL, Huang WC, Chen HL (2009) Fermentation process development for hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*; ATCC 39920. Korean Journal of Chemical Engineering 26:428-432

Chen WY, Marcellin E, Hung J, Nielsen LK (2009) Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Biological Chemistry 284:18007-18014

Chen YH, Li J, Liu L, Liu HZ, Wang Q (2012) Optimization of Flask Culture Medium and Conditions for Hyaluronic Acid Production by a *Streptococcus equisimilis* Mutant Nc2168. Braz. J. Microbiol. 43:1553-1561

Chien LJ, Lee CK (2007) Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. Biotechnology Progress 23:1017-1022

Chien LJ, Lee CK (2007) Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology 77:339-346

Chisti Y and Jauregui-Haza UJ (2002). Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. Biochemical Engineering Journal 10:143-153.

Cleary P, Larkin A (1979) Hyaluronic Acid Capsule: Strategy for Oxygen Resistance in Group A Streptococci. Journal of Bacteriology 140 :1090-1097

Condon S (1987) Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Letters 46:269-280

Cowman MK, Matsuoka S (2005) Experimental approaches to hyaluronan structure. Carbohydrate Research 340:791-809

Cregut M and Rondags E (2013) New insights in agar biorefinery with arylsulphatase activities. Process Biochemistry 48:1861-1871

Cywes C, Wessels MR (2001) Group A Streptococcus tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. Nature 414:648-652

D De Angelis PL (1999) Hyaluronan synthases: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and algal viruses. Cell. Mol. Life. Sci, 56: 670-694

De Angelis PL (2012) Glycosaminoglycan polysaccharide biosynthesis and production: today and tomorrow. *Appl. Microbiol. Biotechnology,* 94:295-305

Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P (1999). The biosynthesis and functionnality of the cell wall of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 76, 159-184.

De Macedo A, Santana M (2012) Hyaluronic acid depolymerization by ascorbate-redox effects on solid state cultivation of *Streptococcus zooepidemicus*; in cashew apple fruit bagasse. World Journal of Microbiology and Biotechnology: 1-7

Don MM, Shoparwe NF (2010) Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. Biochemical Engineering Journal 49:95-103

Duan XJ, Niu HX, Tan WS, Zhang X (2009) Mechanism analysis of effect of oxygen on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 19:299-306

Duan XJ, Yang L, Zhang X, Tan WS (2008) Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 18:718-724

E El-Safory NS, Fazary AE, Lee CK (2010) Hyaluronidases, a group of glycosidases: Current and future perspectives. Carbohydrate Polymers 81:165-181

El-Safory NS, Lee GC, Lee CK (2011) Characterization of hyaluronate lyase from Streptococcus pyogenes bacteriophage H4489A. Carbohydrate Polymers 84:1182-1191

F Fong Chong B, Nielsen LB (2003) Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. Biochemical Engineering Journal 16:153-162

Fong Chong B, Blank LM, McLaughlin R, Nielsen LK (2005) Microbial hyaluronic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology 66:341-351

Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG (1997) Hyaluronan: Its nature, distribution, functions and turnover. J. Intern. Med. 242:27-33

G Gerecht S, Burdick JA, Ferreira LS, Townsend SA, Langer R, and Vunjak-Novakovic G (2007) Hyaluronic acid hydrogel for controlled self-renewal and differentiation of human embryonic stem cells 104: 11298-11303

Goh LT (1998) Fermentation studies of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. PhD Thesis. University of Queensland. 357p

Gritsenko P, Ilina O, Friedl P (2012) "Interstitial guidance of cancer invasion". *The Journal of Pathology* 226: 185–199

Huang WC, Chen SJ, Chen TL (2006) The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. Biochemical Engineering Journal 32:239-243

Huang WC, Chen SJ, Chen TL (2008) Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. Biochemical Engineering Journal 40:460-464

Hubbard C, McNamara JT, Azumaya J, Patel MS, Zimmer J (2012) The Hyaluronan Synthase Catalyzes the Synthesis and Membrane Translocation of Hyaluronan. Journal of Molecular Biology 418:21-31

Hynes WL, Ferretti JJ (1989) Sequence analysis and expression in Escherichia coli of the hyaluronidase gene of *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. Infection and Immunity 57:533-539

Hynes WL, Hancock L, Ferretti JJ (1995) Analysis of a second bacteriophage hyaluronidase gene from *Streptococcus pyogenes*: Evidence for a third hyaluronidase involved in extracellular enzymatic activity. Infection and Immunity 63:3015-3020

Im JH, Song JM, Kang JH, Kang DJ (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 36:1337-1344

Izawa N, Hanamizu T, Iizuka R, Sone T, Mizukoshi H, Kimura K, Chiba K (2009) *Streptococcus thermophilus* produces exopolysaccharides including hyaluronic acid. Journal of Bioscience and Bioengineering 107:119-123

Izawa N, Serata M, Sone T, Omasa T, Ohtake H (2011) Hyaluronic acid production by recombinant *Streptococcus thermophilus*. Journal of Bioscience and Bioengineering 111:665-670

Jagannath S, Ramachandran KB (2010) Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. Biochemical Engineering Journal 48:148-158

Jahn MJ, Baynes W, Spiteller G (1999) The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species. Carbohydrate Research 321:228-234

Jedrzejas MJ, Mello LV, De Groot BL, Li SL (2002) Mechanism of hyaluronan degradation by *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase - Structures of complexes with the substrate. Journal of Biological Chemistry 277:28287-28297

Jia Y, Zhu J, Chen X, Tang D, Su D, Yao W, Gao X (2013) Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for the efficient biosynthesis of uniform hyaluronic acid with controlled molecular weights. Bioresource Technology, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.150

Johns MR, Goh LT, Oeggerli A (1994) Effect of pH, agitation and aeration on hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology Letters 16:507-512

K Kang DY, Kim WS, Heo IS, Park YH and Lee S (2010) Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FlFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS). J. Sep. Sci. 33:3530-3536

Kar T, Delvigne F, Destain J, Thonart P (2011) Bioreactor scale-up and design on the basis of physiologically relevant parameters: application to the production of lipase by Yarrowia lipolytica. Biotechnol. Agron. Soc. 15:585-595.

Kim JH, Yoo SJ, Oh DK, Kweon YG, Park DW, Lee CH, Gil GH (1996) Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. Enzyme and Microbial Technology 19:440-445

Kim EJ, Sabra W and Zeng AP (2003) Iron deficiency leads to inhibition of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in cultures of Pseudomonas aeruginosa PAO1. Microbiology-(UK) 149:2627-2634.

Kim SJ, Park SY, Kin CW (2006) A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 16:1849-1855Kogan G,

Kumari K, Baggenstoss BA, Parker AL, Weigel PH (2006) Mutation of two intramembrane polar residues conserved within the hyaluronan synthase family alters hyaluronan product size. Journal of Biological Chemistry 281:11755-11760

L Lai ZW, Rahim RA, Ariff A, Mohamad R (2011) Medium formulation and impeller design on the biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* ATCC 39920. African Journal of Microbiology Research 5:2114-2123

Lai ZW, Rahim RA, Ariff AB, Mohamad R (2012) Biosynthesis of high molecular weight hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus* using oxygen vector and optimum impeller tip speed. Journal of Bioscience and Bioengineering 114: 286-291

Lenormand H, Deschrevel B, Vincent JC (2011) pH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins: Part I. Dual aspect of the pH-dependence. Matrix Biology 29:330-337

Leonard BAB, Woischnik M, Podbielski A (1998) Production of stabilized virulence factor-negative variants by group A streptococci during stationary phase. Infection and Immunity 66:3841-3847

Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J (2008a) 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 99:8532-8536

Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun J (2008b) Influence of culture modes on the microbial production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. Biotechnology and Bioprocess Engineering 13:269-273

Liu L, Yang H, Zhang D, Du G, Chen J, Wang M, Sun J (2009a) Enhancement of hyaluronic acid production by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus* via the addition of n-Dodecane as an oxygen vector. Journal of Microbiology and Biotechnology 19:596-603

Liu L, Du G, Chen J, Wang M, Sun M (2009b) Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. Bioprocess and Biosystems Engineering 32:755-763

Liu L, Du G, Chen J, Zhu Y, Wang M, Sun J (2009c) Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. Bioresource Technology 100:362-367

Liu L, Yang H, Du G, Chen J, Wang M (2009d) Enhanced hyaluronic acid production of Streptococcus zooepidemicus by shifting dissolved oxygen level based on broth rheology and oxygen mass transfer characteristics. Food Biotechnology 23:148-161

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 46:383-388

Liu L, Li Y, Li J, Du G, Chen J (2011) Microbial production of hyaluronic acid: Current state, challenges, and perspectives. Microbial Cell Factories: 99.

Lowry KM, Beavers EM (1994) Thermal-Stability of Sodium Hyaluronate in Aqueous-Solution. J. Biomed. Mater. Res. 28:1239-1244

Ma Z, Geng J, Zhang H, Yu H, Yi L, Lei M, Lu CP, Fan HJ, Hu S (2011) Complete genome sequence of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* strain ATCC 35246. Journal of Bacteriology 193:5583-5584

Maclennan AP (1956) The isolation and characterization of a hyaluronidase produced by a capsulated strain of group C streptococcus. Journal of general microbiology 14:143-152

Marcellin E, Steen JA, Nielsen K (2014) Insight into hyaluronic acid molecular weight control. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1-10.

Marion C, Stewart JM, Tazi MZ, Burnaugh AM, Linke CM, Woodiga SA, and King SJ (2012) Streptococcus pneumoniae Can Utilize Multiple Sources of Hyaluronic Acid for Growth. Infection and Immunity 80:1390-1398

Matsubara C, Kajiwara M, Akasaka H, Haze S (1991) Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies on the biosynthesis of hyaluronic acid. Chem Pharm Bull 39, 2446-2448

Mc Manus JFA and Mowry RW (1960) Staining methods. Histologic and Histochemical. P.B Hoeber, New York.

Metzner AB, Otto RE (1957) Agitation of non-Newtonian fluids. Am Inst Chem Eng J 3:3–10

Meyer K, Palmer JW (1934) The polysaccharide of the vitreous humor. Journal of Biology and Chemistry, 107, 629–634

Nakamura T, Majima M, Kubo K, Takagaki K (1990). Hyaluronidase assay using fluorogenic hyaluronate as a substrate. Anal Biochem 191: 21-4.

Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J (2008) Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. Vet. Med. 53:397-411

Nielsen LK, Chen W, Saldana ESM (2009) Production of hyaluronic acid. Brevet : 2009/ 026635A1

Olmos E, Mehmood N, Husein LH, Goergen JL, Fick M, Delaunay S. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of Streptomyces. Bioprocess and Biosystems Engineering 36:259-272

O'Regan M, Martini I, Crescenzi F, De Luca C et al (1994) Molecular Mechanisms and genetics of hyaluron Biosynthesis. Int J Biol Macromol 16:283–286

Oueslati N, Leblanc P, Harscoat Schiavo C, Rondags E, Meunier S, Kapel R, Marc I (2014) CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. Carbohydrates Polymers

Palomares LA and Ramírez OT (2003) Bioreactor Scale-Up, Encyclopedia of Cell Technology. John Wiley & Sons, Inc.

Parker PM (2011). The 2011-2016 World Outlook for Collagen and (hyaluronic Acid) HA-Based Biomaterials, Icon Group International, 217 p.

Patil KP, Chaudhari Bhushan L, Chincholkar Sudhir B (2009) Screening for pharmaceutically important exopolysaccharide producing *Streptococci* and partial optimization for EPS production. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 3: 329-340

Penney DP, Powers JM, Frank M, Willis C and Churukian C (2002) Analysis and testing of biological stains - The Biological Stain Commission procedures. Biotechnic and Histochemistry 77:237-275

Pires A, Santana M (2010) Rheological Aspects of Microbial Hyaluronic Acid. J. Appl. Polym. Sci. 122: 126-133

Pires A, Santana M (2010) Metabolic Effects of the Initial Glucose Concentration on Microbial Production of Hyaluronic Acid. Applied Biochemistry and Biotechnology 162: 1751-1761

Pires A, Eguchi S, Santana M (2010) The Influence of Mineral Ions on the Microbial Production and Molecular Weight of Hyaluronic Acid. Applied Biochemistry and Biotechnology 162: 2125-2135

Prasad SB, Ramachandran KB, Jayaraman G (2012) Transcription analysis of hyaluronan biosynthesis genes in *Streptococcus zooepidemicus* and metabolically engineered *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology 94: 1593-1607

Price RD, Berry MG, Navsaria HA (2007) Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. Journal of plastic, reconstitutive and aesthetic surgery 60: 1110-1119

Priestnall S, Erles K (2010) *Streptococcus zooepidemicus*: An emerging canine pathogen. The Veterinary Journal 188: 142-148

Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J Biol Chem 217: 959-66

Rutjes AW, Jüni P, Da Costa BR, Trelle S, Nüesch E, Reichenbach S (2012) "Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis.". *Annals of internal medicine* 157: 180–91

Sahoo S, Panda PK, Mishra SR, Tripathy A, Ellaiah P (2007) Effect of some inhibitors on hyaluronidase production by *Streptococcus mitis* MTCC 2695 and *Streptococcus equi* SED 9 species. Biosciences Biotechnology Research Asia 4:297-299

Schiraldi C, La Gatta A, De Rosa M (2008) Biotechnological Production and Applications of Hyaluronan. In Elnashar M (ed) Biopolymers, chapter 20

Shah MV, Badle SS, Ramachandran KB (2013) Hyaluronic acid production and molecular weight improvement by redirection of carbon flux towards its biosynthesis pathway. Biochemical Engineering Journal 80: 53-60.

Shiedline A, Bigelow R, Christopher W, Arbari S, Yang L, Maier RV, Wainwright N, Childs A, Miller RJ (2004) Evaluation oh hyaluronan from different sources: *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. Biomacromolecules 5: 2122-2127

Soltes L, Stern R, Gemeiner P (2006) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. Biotechnology Letters 29:17-25

Smidsrød O, Haug A (1967) Precipitation of acidic polysaccharides by salts in ethanol–water mixtures. Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia 16(3):1587–1598

Smith RF and Willet NP (1968) Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms.

Somerville GA and Proctor RA (2009) At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in Staphylococci. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73:233-248.

Sousa AS, Guimarães AP, Gonçalves CV, Silva IJ, Cavalcante CL, Azevedo DCS (2009) Purification and characterization of microbial hyaluronic acid by solvent precipitation and Size-Exclusion Chromatography. Separation Science and Technology 44(4):906-923

Spickenreither M, Braun S, Bernhardt G, Dove S, and Buschauer A (2006) Novel 6-O-acylated vitamin C derivatives as hyaluronidase inhibitors with selectivity for bacterial lyases. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16:5313-5316

Sun J, Wang M, Chen Y, Shang F, Ye H, Tan T (2011) Understanding the Influence of Phosphatidylcholine on the Molecular Weight of Hyaluronic Acid Synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. Applied Biochemistry and Biotechnology: 1-11

Sun XY, Yang DD, Wang YY, Geng HR, He XH, Liu H (2013) Development of a markerless gene deletion system for *Streptococcus zooepidemicus*: functional characterization of hyaluronan synthase gene. Applied Microbiology and Biotechnology 97:8629-8636

T Tlapak-Simmons VL, Baron CA, Weigel PH (2004) Characterization of the purified hyaluronan synthase from Streptococcus equisimilis. Biochemistry 43:9234–9242

V Vazquez JA, Montemayor MI, Fraguas J, Murado MA (2009) High production of hyaluronic and lactic acids by *Streptococcus zooepidemicus* in fed-batch culture using commercial and marine peptones from fishing by-products. Biochemical Engineering Journal 44:125-130

Volpi N, Maccari F (2003) Purification and characterization of hyaluronic acid from the mollusc bivalve Mytilus galloprovincialis. Biochimie 85:619-625

W Wei Z, Fu Q, Chen Y, Cong P, Xiao S, Mo D, He Z, Liu X (2012) The capsule of *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* is a target for attenuation in vaccine development. Vaccine 30:4670-4675

Weigel PH, DeAngelis PL (2007) Hyaluronan Synthases: A Decade-plus of Novel Glycosyltransferases, 282: 36777-36781

Wessels MR, Moses AE, Goldberg JB, Dicesare TJ (1991) Hyaluronic-Acid Capsule Is a Virulence Factor for Mucoid Group-a Streptococci. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88:8317-8321

Woolcock JB (1974) The capsule of *Streptococcus equi*. Journal of general microbiology 372-375

Wu TF, Huang WC, CheYC, Tsay YG, Chang CS (2009) Proteomic investigation of the impact of oxygen on the protein profiles of hyaluronic acid-producing *Streptococcus zooepidemicus*. Proteomics 9:4507-4518

Y Yamada T, Kawasaki T (2005) Microbial synthesis of hyaluronan and chitin: New approaches. Journal of Bioscience and Bioengineering 99:521-528

Z Zhang J, Ding X, Yang L, Kong Z (2006) A serum-free medium for colony growth and hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* NJUST01. Applied Microbiology and Biotechnology 72:168-172

Zhang X, Duan XJ, Tan WS (2010) Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Food Chemistry 119:1643-1646

Zhou H, Ni J, Huang W, Zhang J (2006) Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. Separation and Purification Technology 52(1):29-38

- Référence webographique -

- http://www.genome.jp/kegg/pathway.html

SELECTION ET MISE EN OEUVRE « OPTIMALE » DE SOUCHES MICROBIENNES EN BIOREACTEUR, POUR LA PRODUCTION D'ACIDE HYALURONIQUE

Résumé. Ce travail se proposait de développer, à l'échelle du laboratoire, un procédé de production microbienne d'acide hyaluronique (AH), biopolymère d'intérêt pour la cosmétique et la santé, chez une bactérie lactique naturellement productrice, *Streptococcus zooepidemicus*. Une étude bibliographique a permis d'identifier les points potentiellement critiques pour ce travail qui sont la composition du milieu de culture (identification de nutriments essentiels à la synthèse d'acide hyaluronique), les conditions opératoires et plus particulièrement d'oxygénation (transfert d'oxygène mais aussi maintien du potentiel d'oxydo-réduction), en relation avec les performancesde production et le métabolisme des souches considérées.

Une étape préliminaire a consisté en un développement et une amélioration de techniques analytiques pour disposer d'outils pertinents de suivi du métabolisme de *Streptococcus zooepidemicus*. La quantification de la biomasse hors acide hyaluronique ainsi que la détection de l'activité hyaluronidasique ont ainsi été développées tandis que d'autres méthodes chromatographiques et enzymatiques ont été simplement appliquées et validées aux substrats et métabolites considérés.

La mise en œuvrede souches « environnementales » prélevées sur des sites infectieux chez le cheval, ainsi que de souches de collection,a permis dans un premier temps de formuler un milieu de culture etde définir des conditions de mise en œuvre exploitables à plus grande échelle pour la production d'AH. Des résultats très encourageants ont pu être obtenus avec des productions d'AH supérieures aux essais de la littérature, tout en mettant en avant des facteurs influents cruciaux tels que la concentration initiale en glucose ou encore l'oxygénation des cultures. L'influence de ces facteurs a été étudiée par la suite par le biais de cultures en bioréacteur de laboratoire en modes discontinu et discontinu-alimenté avec pour résultat l'obtention d'un mode de mise en œuvre et de conditions physico-chimiques de production améliorées.

En parallèle, une étape importante de ce travail a consisté en une approche d'amélioration de souches « environnementales » par mutagénèse aléatoire, les performances de ces souches s'avérant initialement décevantes. Des mutants surproducteurs ont ainsi été générés, caractérisés au niveau de leurs performances métaboliques et conservés.

En dernier lieu, un des mutants les plus performant a été mis en œuvre dans les conditions et le mode de culture sélectionnés précédemment. Tant le niveau de production d'AH, la productivité associée, que les tailles obtenues ont permis de valider ce travail de développement d'un procédé microbien de production d'AH, tout en identifiant de nouvelles voies d'amélioration.

Mots clés : acide hyaluronique, production microbienne, amélioration de la production, taille moléculaire / concentration

"OPTIMAL" SELECTION AND IMPLEMENTATION OF MICROBIAL STRAINS IN BIOREACTOR FOR HYALURONIC ACID PRODUCTION

Abstract. This work intended to develop a laboratory scaleproduction process ofhyaluronic acid (HA), a biopolymer of health and cosmetic interest, using a naturally AH producing lactic acid bacterium, *Streptococcus zooepidemicus*. A literature review allowed to identify the following critical points: firstly, the composition of the culture medium (identification of essential nutrients for microbial growth and synthesis of HA), secondly, the oxygenation level (oxygen transfer and associated redox modifications), and finally, in relation with, the production and metabolism abilities of the considered strains.

A preliminary step was dedicated to the developmentorthe improvementof analytical techniques in order todispose of appropriate tools for the monitoring of *Streptococcus zooepidemicus* metabolism. The quantification of the biomass without considering capsular HA fraction as well as detection of hyaluronidase activity have been developed while other chromatographic and enzymatic methods have been more basically applied to and validated with the substrates and metabolites considered.

The laboratory scale cultures of collection (ATCC) as well as "environmental" strains were initially used to formulate a workable cultivation broth and to define suitable culture conditionsfor a use at a larger scale to produce HA. Very positive results were obtained with higher production of HA in comparison with literature assays, while critical influencing factors such as the initial glucose concentration or the oxygenation levelin cultures were highlighted. The influence of these factors was thoroughly studied with bioreactor cultures in both batch and fed-batch modes leading to improved cultivation conditions and culture mode.

In parallel, another important step consisted in the highly performance improvement of initially low HA producing "environmental" strains via random mutagenesis. Very promising overproducing mutants have therefore been generated, characterized in their kinetic and metabolic capabilities and long-term stored.

At last, one of the best and most reliable mutant has been cultivated with the best previously selected medium composition and operating conditions. Both the HA production level, productivity and size observed validated the findings of this process development work, while helping to identify new improvement domains and strategies.

Mots clés : hyaluronic acid, *microbial production*, production optimization, molecular weight / concentration