



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Ingénieries microbienne et enzymatique*

Présentée et soutenue par *CAUDAN Cédric*
Le *17 / 02 / 2012*

Titre : *Caractérisation des Substances Polymériques Extracellulaires de boues granulaires aérobies: propriétés chimiques et implication dans la cohésion du granule*

JURY

<i>Elisabeth Girbal-Neuhauser, Professeur, LBAE, Université Toulouse</i>	<i>Directrice</i>
<i>Mathieu Spérandio, Professeur, LISBP-INSA, Université de Toulouse</i>	<i>Codirecteur</i>
<i>Gilles Guibaud, Professeur, Université de Limoges</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Patrick Di Martino, Professeur, Université de Cergy-Pontoise</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Kim Milferstedt, Chargé de Recherches INRA, LBE Narbonne</i>	<i>Examineur</i>
<i>Bruno Gabriel, Professeur, LBAE, Université Toulouse</i>	<i>Examineur</i>

Ecole doctorale : *SEVAB*

Unité de recherche : *LBAE (Laboratoire de Biotechnologies Environnementales et Agroalimentaires)*

Directeur(s) de Thèse : *Elisabeth Girbal-Neuhauser*
Mathieu Spérandio

Rapporteurs : *Noms des rapporteurs (s'ils ne font pas partie des membre du jury)*

Production scientifique liée à cette thèse :

Caudan C.¹, Filali A.², Lefèbvre D.¹, Spérandio M.², Girbal-Neuhauser E.¹
Extracellular Polymeric Substances (EPS) from aerobic granular sludges: extraction, fractionation and anionic properties. (acceptée le 16 janvier 2012).

Caudan C.¹, Filali A.², Spérandio M.², Lefebvre D.¹, Girbal-Neuhauser E.¹
Extracellular Polymeric Substances (EPS) composition of aerobic granules using an improved multi-step extraction strategy. Poster présenté au Congrès International sur l'Eau de l'IWA, à Montréal en Septembre 2010.

Caudan C.¹, Lefebvre D.¹, Spérandio M.², Girbal-Neuhauser E.¹
Caractérisation des EPS de boues granulaires aérobies: propriétés chimiques et implication dans la cohésion du granule. Congrès du Réseau National Biofilm. 5ème Journée Thématique: les Biofilms au service des Biotechnologies, 24-26 janvier 2012, Narbonne (présentation orale)

1 : Université de Toulouse; UPS, LBAE, Laboratoire de Biotechnologies Agro-alimentaire et Environnementale, EA 4565, Institut Universitaire de Technologie, 24 rue d'Embaquès 32000 Auch, France

2 : Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INRA UMR 792, CNRS UMR 5504, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

Résumé :

Depuis une dizaine d'années, les procédés utilisant des boues granulaires aérobies pour le traitement des effluents ont fait l'objet de nombreuses recherches. Alors que les conditions opératoires conduisant à l'obtention d'agrégats microbiens denses ont pu être définies, peu d'éléments ont été rapportés quant aux mécanismes biologiques favorisant la formation et la stabilité des granules. Diverses études suggèrent toutefois l'implication des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS), composés majeurs de la matrice extracellulaire, sur les propriétés physico-chimiques des granules formés (densité, cohésion). Afin de répondre à cette question, une double approche a été menée, basée d'une part sur l'analyse des propriétés chimiques des EPS extraits de granules, et d'autre part sur des mesures de cohésion réalisées après digestion enzymatique ou chimique des granules en vue d'altérer la matrice d'EPS.

Un procédé d'extraction multi-méthodes incluant des traitements physiques (ultrasons) et chimiques (détergent, chélateur de cations) a été mis au point afin d'extraire les EPS de granules produits en réacteur pilote de type SBR et impliqués dans un procédé aérobie de transformation de l'azote. L'analyse des EPS extraites confirme l'intérêt de ce protocole tant d'un point de vue de son efficacité (épuisement des EPS après 3 séquences) que de sa capacité à fractionner les EPS en ciblant des natures biochimiques (protéines, sucres) et/ou fonctions chimiques (hydrophobicité, caractère anionique) différentes. Ainsi, la comparaison des profils d'extraction à ceux obtenus à partir d'agrégats peu denses (flocs) souligne dans le cas des EPS de granules, la prépondérance de protéines extractibles en présence d'un chélateur de cations. Une analyse par chromatographie anionique confirme la présence de protéines fortement chargées dont le caractère anionique est plus marqué que celui des EPS extraites de boues floculantes, suggérant le rôle potentiel des interactions électrostatiques dans la cohésion des granules.

Les granules prélevés ont par la suite été soumis à divers traitements de type enzymatiques (protéases ou de glycosidases) ou chimiques (EDTA ou NaCl) avant d'être soumis à un test de cohésion (application de contraintes hydrodynamiques en cuve agitée). L'analyse des transferts de matière a montré que la digestion de protéines entraînait un relarguage important de matière organique colloïdale avec libération de calcium mais sans perte significative de cohésion. En contrepartie, la digestion des α (1-4) glucanes semble fragiliser la cohésion des granules car un détachement important de macroparticules (de tailles comprises entre 315 et 2820 μm) non associé à la libération de calcium a été observé après application de la contrainte hydrodynamique. Enfin, le traitement préalable des granules par l'EDTA en tant que chélateur de cations divalents, s'est traduit par une diminution de la taille des granules, un relarguage de calcium et une solubilisation de micro-particules (taille inférieure à 315 μm) entraînant une baisse significative de leur résistance au détachement.

Ces expériences de perturbation de la cohésion des granules permettent donc de mettre en évidence des mécanismes divergents pour les différents composants de la matrice extracellulaire participant à la cohésion des granules. Elles soulignent en particulier le rôle prépondérant des alpha-glucanes dans le maintien de la cohésion ainsi que celui des protéines anioniques susceptibles de participer à l'aggrégation via des interactions électrostatiques impliquant le calcium.

Enfin, l'observation des granules en microscopie confocale a confirmé le rôle complémentaire de ces polymères en montrant pour chacun d'eux une organisation structurale particulière: les alpha-glucanes étant préférentiellement organisés en guanques polysaccharidiques entourant les bactéries, elles-mêmes enchassées dans un réseau protéique dense.

Mots clés : Substances Exopolymériques, granules, protéines anioniques, polysaccharides, cohésion.

Summary:

For ten years, methods using aerobic granular sludge process for wastewater treatment have been extensively studied. Although the operating conditions leading to the production of dense microbial aggregates have been defined, little evidence has been reported about the biological mechanisms promoting the formation and stability of granules. However, exopolymeric substances (EPS) are major components of the extracellular matrix and various studies have suggested their involvement of, in the physicochemical properties of the formed granules (density, cohesion). To answer this question, a dual approach was undertaken in this work, based partly on analysis of the chemical properties of the EPS extracted from granules, and also on measurement of the granule cohesion performed after enzymatic digestion or chemical treatment of the EPS matrix.

A multi-methods extraction protocol including physical steps (ultrasound) and chemical steps (non-ionic detergent, cation chelating agent) was developed in order to extract EPS from granules cultured in a SBR pilot and performing aerobic nitrogen removal. Analysis of the extracted EPS has confirmed the efficacy (depletion of EPS after 3 sequences) and the ability of this multi-methods protocol for EPS fractionation according to their biochemical nature (proteins, polysaccharides) and / or chemical functions (hydrophobic, anionic character). Comparison of the extraction profiles obtained from dense granules with those obtained from low-density aggregates (flocs) pointed out the preponderance in granule EPS of extractable proteins in the presence of a cation chelating agent. Analysis by anion chromatography of the granule EPS extracts confirmed the presence of highly charged proteins showing stronger anionic character than that of proteins extracted from flocculent sludge, suggesting thus a potential role of electrostatic interactions in the cohesion of granules.

The collected granules were subsequently subjected to various treatments including enzymatic digestions (proteases or glycosidases) or chemical actions (EDTA or NaCl). The cohesion of both native and treated granules was then assayed by application of a controlled hydrodynamic strain in a stirred tank. Analysis of mass transfer showed that protein digestion has provoked colloidal organic matter release with simultaneous calcium discharge but the granule cohesion was not significantly altered. In return, the cohesion of granules was decreased after α (1-4) glucan digestion since important detachment of macroparticles (with sizes of between 315 and 2820 microns) was observed after application of the hydrodynamic stress. This macroparticulate detachment was not associated with any calcium release. Finally, treatment of granules with the chelator EDTA has resulted in the decrease of the granule size, the solubilization of micro-particles (smaller than 315 microns) and important calcium release, leading to significant drop in the resistance of granules towards detachment.

These experiments allow thus to highlight that granule cohesion is carried out through diverging mechanisms involving different components of the extracellular matrix. In particular, they point out the role of alpha-glucan in maintaining cohesion and that of anionic proteins in promoting aggregation through electrostatic interactions involving calcium.

At last, observation of granules by confocal microscopy confirmed the complementary role of these polymers, showing, for each of them, a particular structural organization: the alpha-glucans appeared preferentially organized in polysaccharidic cuticules surrounding the bacteria themselves encircled by a dense protein network.

Keywords: exopolymeric substances, granules, anionic proteins, polysaccharides, cohesion.

Nomenclature

Abréviations

μ : taux de croissance

μ_{\max} : taux de croissance maximum

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AOB : Bactéries Oxydant l'Ammonium

ATP : Adénosine triphosphate

BCA : Acide BiCinchonique

BGrN : Boue granulaire Native

BSA : Albumine de Sérum Bovin

C : Carbone

CER : Résine échangeuse de cations

CLSM : Microscope Confocal à Balayage Laser

ConA : Concanavaline A

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole, dichlorure

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DCO : Demande Chimique en Oxygène

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

Eq. : Equivalent

FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence

FITC : IsoThioCyanate de Fluoréscéine

G-6-P : Glucose-6-Phosphate

G6P-DH : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

GrN : Granules Natifs

GrT : Phase Granulaire après Traitement

GrTHy : Phase Granulaire après contraintes Hydrodynamiques

Hab. : Habitant

Ks : Constante de Monod

MaT : Phase Macroparticulaire après traitement

MaTHy : Phase Macroparticulaire après contraintes Hydrodynamiques

MiTHy : Phase Microparticulaire après contraintes Hydrodynamiques

MES : Matières En Suspension

MS : Matière Sèche

MV : Matière Volatile

MVS : Matière Volatile en Suspension

N : Azote

NAD : Nicotine Adénine Dinucléotide

NADH : Nicotine Adénine Dinucléotide Hydrogénée

NOB : Bactéries Oxydant les Nitrites

PN : Protéines

PS : Polysaccharides

PBS : Tampon Phosphate Salin

R : coefficient de corrélation

SBR : Réacteur Batch Séquencé

SoMiT : Solution et Microparticules après Traitement

SoTHy : Phase Soluble après contraintes Hydrodynamiques

STEP : STation d'EPuration

SVI : Sludge Volume Index

UV: Ultraviolet

Unités

kDa : kilodalton

kg : kilogramme

g : gramme

h : heure

j : jour

mL : millilitre

L : litre

μm : micromètre

nm : nanomètre

mm : millimètre

m^3 : mètre cube

min : minute

mol : mole

nmol : nanomole

M : mole par litre

mM : millimole par litre

s : seconde

Remerciements

En pensant à cette thèse, ce qui me vient à l'esprit en premier, c'est l'énorme enrichissement que j'en retire. Un enrichissement professionnel, un enrichissement scientifique et bien sûr, un enrichissement humain.

C'est pourquoi, Je voudrais tout d'abord exprimer ma profonde gratitude envers mes directeurs de thèse Elisabeth Neuhauser et Mathieu Spérandio pour m'avoir fait confiance et m'avoir guidé le long de ce parcours.

Je tiens aussi à remercier Gilles Guibaud, Patrick Di Martino, Kim Milferstedt et Bruno Gabriel pour avoir accepté de juger mon travail et ainsi m'avoir fait profiter de leur expertise.

Je voudrais dire un grand merci à Valérie Létisse, Dominique Lefebvre et Yolaine Bessiaire pour leur aide, leurs conseils et leur patience.

Ces dernières années n'auraient pas eu le même visage si elles n'avaient pas été l'occasion de rencontrer Ahlem et Angela. J'ai véritablement adoré travailler avec vous deux au sein de la « granule team », et je suis fiers que nous ayons vu ensemble nos bébés grandir et devenir forts et... Plus ou moins velus aussi...

Merci aussi à Irene pour sa précieuse amitié, pour sa bonne humeur, sa générosité, pour avoir été là, tout simplement.

A Claire et Caroline, sans qui mes journées à Auch auraient été bien trop silencieuses, je dis également merci, du fond du cœur.

Ma sincère reconnaissance va également à l'ensemble des équipes du LBAE et de l'équipe Ecosystèmes microbiens et bioprocédés d'épuration et de valorisation au LISBP. Une thèse est une œuvre collective, et vous en êtes tous un peu les auteurs. Merci, donc à Valérie, Hervé, Lucie, Cathy, Géraldine, Myriam, Maryse, Laurent, Eliane, Philippe, Pauline, Benoit, Nathalie, Frédéric, Guillaume à Auch et à Sébastien, Xavier, Etienne, Sophie, Mathieu et Matthieu, Yoan, Mansour, Delphine, Evrard à Toulouse

Et enfin, un grand merci à ma famille enfin, mes parents, et mes sœurs, parce que je sais que en toutes circonstances, qu'ils soient loin ou qu'ils soient proches, j'ai toujours pu compter sur eux, et je le pourrai toujours.

Sommaire

Introduction :	1
Chapitre 1 : Recherche bibliographique	3
I. Les procédés de traitement des eaux par voie biologique	4
I.1. Procédés par boues activées	4
I.2. Procédés par biomasse fixée	5
I.3. Activité biologique et épuration	6
I.4. Problématiques et enjeux des agrégats biologiques	10
I.5. Traitement des eaux usées par les granules aérobies	10
II. Les granules bactériens aérobie : organisation et propriétés fonctionnelles	11
II.1. Définition et intérêts	11
II.2. Les facteurs favorables à la granulation	13
II.3. Propriétés microbiologiques des granules	14
II.4. Propriétés physico-chimiques et densification des granules	16
II.5. Agrégation et Modèle DLVO	18
III. Propriétés chimiques des EPS	18
III.1. Nature chimique et diversité	18
III.2. Description de la structure microscopique de la matrice d'EPS des agrégats bactériens comme un gel de polymères	24
III.3. Influence de l'environnement chimique	32
IV. Méthodes d'étude des EPS	32
IV.1. Extraction des EPS	33
IV.2. Analyse des propriétés chimiques des EPS	36
IV.3. Utilisation d'agents spécifiques	38
V. Rôle des EPS dans la cohésion des granules	39
V.1. Influence de la nature chimique des EPS	39
V.2. Rôle des interactions chimiques	43
V.3. Stratification biochimique des granules	46
Conclusions	49
VI.1. Conclusion de l'étude bibliographique	49
VI.2. Objectifs de la thèse	51
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	54
I. Production des granules en réacteur SBR	55
I.1. Le réacteur SBR	55
I.2. Propriétés des boues granulaires	57
II. Caractérisation des granules	58
II.1. Paramètres morphologiques	58
II.2. Observation des granules en microscopie confocale	60
III. Traitements enzymatiques et chimiques des granules	64
III.1. Digestions enzymatiques	65
III.2. Traitements chimiques	65
III.3. Caractérisation des transferts de matières	66
IV. Mesure de la résistance des granules aux contraintes hydrodynamiques	67
IV.1. Application des contraintes hydrodynamiques	67
IV.2. Caractérisation des phénomènes de détachement	68
V. Caractérisation des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS)	69
V.1. Extraction des EPS	69
V.2. Quantification des EPS	71

V.3.	Quantification de la G6P-DH	74
V.4.	Techniques chromatographiques	75
Chapitre 3 : Propriétés générales des boues granulaires étudiées		79
I.	Activité microbienne des boues granulaires	80
II.	Propriétés physiques des granules	81
II.1.	Aspect et morphologie des granules.....	81
II.2.	Mesure des dimensions des granules	82
II.3.	Bilan	82
III.	Mesure de la résistance des granules aux contraintes hydrodynamiques.....	83
III.1.	Test de résistance sur les granules de R1	83
III.2.	Test de résistance sur les granules de R2	86
IV.	Localisation des EPS et des microorganismes au sein des granules	89
IV.1.	Observation des granules natifs.....	89
IV.2.	Observation des effets des contraintes hydrodynamiques.....	95
V.	Conclusion.....	99
Chapitre 4 : Extraction et caractérisation des EPS des boues granulaires		101
I.	Extraction des EPS de granules	102
I.1.	Application du protocole multi-méthodes	102
I.2.	Effet de la sonication	104
I.3.	Effet d'un broyage aux billes de verre.....	107
I.4.	Protocole retenu	109
II.	Fractionnement et caractérisation biochimique des EPS extraites des granules	110
II.1.	Fractionnement lié aux méthodes d'extraction	110
II.2.	Fractionnement lié à la répétition des séquences d'extraction successives	113
III.	Analyse de la diversité moléculaire des EPS du granule par chromatographie	114
III.1.	Analyse des EPS par chromatographie d'exclusion stérique	114
III.2.	Etude de la charge négative nette des EPS protéiques par chromatographie d'échange d'anions.....	118
IV.	Conclusions et discussion.....	122
Chapitre 5 : Etude du rôle des EPS dans la cohésion des granules		126
I.	Altération des granules par digestion enzymatique des EPS.....	127
I.1.	Effets des enzymes sur la matrice d'EPS des granules.....	127
I.2.	Analyse de la cohésion des granules digérés par les enzymes	132
I.3.	Distribution des EPS après altération de la cohésion des granules.....	139
I.4.	Rôles des différents types moléculaires d'EPS.....	143
II.	Etude des fonctions chimiques impliquées dans l'agrégation	145
II.1.	Effets de traitements chimiques	145
II.2.	Effets des traitements chimiques sur la résistance au détachement des granules ..	148
II.3.	Rôle des interactions ioniques et du pontage calcium.....	155
Conclusions générales.....		159
Liste des références bibliographiques.....		165
Annexes		175
Annexe 1 : Images confocales de granules en coupe		176
Annexe 2 : Calcul du temps de pénétration à 90 % de la savinase dans les granules (t ₉₀)		192

Liste des figures

Figure 1 : Principe de fonctionnement d'une station d'épuration par voie biologique à boues activées.	4
Figure 2 : Image d'un floc bactérien issu d'un bassin d'aération de station d'épuration.	5
Figure 3 : Principe de fonctionnement d'un bioréacteur à membrane émergée.	6
Figure 4 : Digestion et/ou mise en réserve ou excrétion de la matière organique par les bactéries.	7
Figure 5 : Représentation des substrats et produits issus de la croissance des populations bactériennes hétérotrophes et autotrophes.	8
Figure 6 : Exemples de configurations des procédés à boues activées traitant l'azote	9
Figure 7 : Le shunt des nitrates.	9
Figure 8 : Exemple d'évolution des MES et SVI30 au cours de la granulation	11
Figure 9 : Image de granules vus au microscope optique	12
Figure 10 : Evolution du SVI des boues activées aérobies au cours du temps pour trois conditions hydrodynamiques.	13
Figure 11 : Relations entre les taux de croissance spécifiques maximums et la concentration en substrat pour deux microorganismes à stratégie « K » et « r ».	15
Figure 12 : Evolution de la quantité en protéines et de polysaccharides extraits par ultrasonication pendant la granulation.	17
Figure 13 : classement des acides aminés selon les propriétés chimiques de leur chaîne latérale	19
Figure 14 : structure de l'hélice α et du feuillet β impliqués dans la structure secondaire des protéines.	20
Figure 15 : Structure tertiaire des protéines	21
Figure 16 : Formule développée de l'amylose	22
Figure 17 : Formule développée du Dextrane	22
Figure 18 : Formule développée de la Cellulose	23
Figure 19 : Formule développée de l'alginate	23
Figure 20 : Décomposition de la réponse τ d'un gel à un stress mécanique sinusoïdal γ en une composante en phase τ' et une composante déphasée de 90° τ''	24
Figure 21 : Evolution de la résistance d'un gel de BSA en fonction de la concentration protéique.	25
Figure 22 : Relation entre les propriétés de gels protéiques et la proportion d'acides aminés hydrophobes des protéines qui les composent.	26
Figure 23 : Evolution de la turbidité relative de solutions de protéines à différentes concentrations en fonction du pH	26
Figure 24 : Formation du gel à base d'alginate en présence de calcium selon Sobeck and Higgins (2002).	27
Figure 25 : Effet du calcium sur les gels composés d'un mélange protéine de lactosérum κ -carraghénanes	28
Figure 26 : Mesures des paramètres rhéologiques des granules.	29
Figure 27 : Evolution de l'amplitude du module de stockage G'_0 de granules en fonction de la concentration en NaCl, du pH et de la température.	30
Figure 28 : Evolution des paramètres rhéologiques d'une solution de polysaccharides extraits de la matrice d'EPS de granules en fonction du pH.	31
Figure 29 : Evolution de l'amplitude du module de stockage G'_0 d'une solution de polysaccharides extraits de la matrice d'EPS de granules en fonction de la concentration en protéines ajoutées au mélange.	31
Figure 30 : Actions successives de méthodes d'extraction d'EPS ciblant différentes catégories d'interaction chimiques.	35
Figure 31 : Relation entre la quantité de cations divalents et la quantité de polymères extraits à partir de boues activées	39
Figure 32 : Image d'un granule marqué et observé au microscope confocal à balayage laser (CLSM) après hydrolyse enzymatique	40
Figure 33 : Spécificité de l' α -amylase et de la β -amylase.	41
Figure 34 : Evolution des quantités de polysaccharides et de protéines extraits de floccs de boues activées en fonction du rapport C/N de l'alimentation.	42

Figure 35 : Evolution au cours du temps de l'amplitude du module d'élasticité G'_0 d'un granule soumis à l'action des différentes enzymes	42
Figure 36 : Echelle de la force des liaisons.	43
Figure 37 : Représentation schématique du pontage cationique à l'intérieur d'un agrégat bactérien ...	44
Figure 38 : Influence de la déstructuration des liaisons ioniques par ajout d'EDTA sur la variation d'énergie d'érosion des floes de boues activées.....	44
Figure 39 : Evolution des paramètres rhéologiques d'une solution d'EPS extraites de granules en fonction du pH.....	45
Figure 40 : Image d'un granule marqué observé au microscope confocale à balayage laser.....	47
Figure 41 : Fluorescence relative de chaque épaisseur d'une cryosection de 20 μm d'un granule.....	48
Figure 42 : Observation en microscopie confocal d'une microcolonie bactérienne de biofilm	48
Figure 43 : Fonctionnement des réacteurs en batch séquencé ou « sequenced batch reactor » (SBR) .	56
Figure 44 : « Binarisation » des photographies de granules en fond blanc avec éclairage par en dessous pour mesures des dimensions des agrégats par le logiciel Visilog.....	59
Figure 45 : Protocole d'obtention de profils d'intensité de marquage des coupes transversales de granules vues au microscope confocal.	64
Figure 46 : Protocole de fractionnement après traitements enzymatiques ou chimiques.....	66
Figure 47 : Schéma d'une cuve agitée.....	67
Figure 48 : Protocole de fractionnement des granules pour la mesure de leur résistance aux contraintes hydrodynamiques.	68
Figure 49 : protocole d'extraction des EPS des granules en trois étapes.	70
Figure 50 : dosage de gammes d'acide glucuronique en utilisant différentes proportions de la solution de travail 1 et de solution de MHDP	73
Figure 51 : Catalyse de l'hydrolyse du D-glucose-6-phosphate par la G6P-DH.	74
Figure 52 : Courbe étalon utilisée pour la mesure des poids moléculaires des protéines séparées par une colonne de type ProtK804.	76
Figure 53 : courbe étalon de la colonne Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)	78
Figure 54 : Epuration de l'azote sous forme ammoniacque (NH_4^+) et de la matière organique mesurée par la DCO par granules des réacteurs R1 et R2.....	80
Figure 55 : Photographies des granules natifs des deux réacteurs.	81
Figure 56 : Répartition des diamètres des granules des réacteurs R1 et R2.....	82
Figure 57 : Photographies, avec éclairage par en dessous, des granules natifs du réacteur R1 avant et après contraintes hydrodynamiques.	84
Figure 58 : Distribution des diamètres en part du volume total de particule des granules du réacteur R1 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL.	85
Figure 59 : Représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres des granules du réacteur R1 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL.....	86
Figure 60 : Distribution des diamètres en part du volume total de particule des granules du réacteur R2 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL à l'aide du logiciel Visilog.	87
Figure 61 : Représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres des granules du réacteur R2 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL.....	88
Figure 62 : Répartition globale des polysaccharides à résidus glucose ou mannose dans les granules de R1.	90
Figure 63 : Répartition globale des protéines dans les granules de R1.	90
Figure 64 : Analyse à l'échelle locale de la distribution des polysaccharides et des bactéries dans les granules de R1 natifs	93
Figure 65 : Analyse à l'échelle locale de la distribution des protéines et des bactéries dans les granules de R1 natifs	94
Figure 66 : Répartition des polysaccharides et micro-organismes dans les granules de R1 soumis à une contrainte hydrodynamique ou natifs.....	96
Figure 67 : Répartition des protéines et micro-organismes dans les granules de R1 soumis à une contrainte hydrodynamique ou natifs	98
Figure 68 : protocole multiméthode d'extraction des EPS des agrégats bactériens.....	103
Figure 69 : Modélisation mathématique de la quantité d'EPS extraites.....	103

Figure 70 : EPS totaux extraites de granules par deux séquences successives du protocole multi-méthode.	105
Figure 71 : Comparaison des efficacités des protocoles d'extractions optimisés et non optimisés appliqués à l'extraction des EPS de granules.	106
Figure 72 : EPS totaux extraites de granules par deux séquences successives du protocole multi-méthode utilisant les billes de verre.	107
Figure 73 : Mesure de l'activité G6P-DH dans les solutions d'EPS extraites de granules par des traitements par les billes de verre de 10, 20 et 30 min.	108
Figure 74 : Comparaison des efficacités du protocole d'extraction utilisant les billes de verre au protocole de référence appliqué à l'extraction des EPS de granules.	108
Figure 75 : Distribution des différents types d'EPS entre les étapes d'extractions.	111
Figure 76 : Répartition des EPS extraites par les étapes US, Tween et EDTA selon l'origine des matrices biologiques.	112
Figure 77 : Distribution des différents types d'EPS extraites le protocole multi-méthodes optimisé entre les quatre séquences successives effectuées.	113
Figure 78 : Profils chromatographiques sur colonne de gel filtration Protein K 804 des tailles d'EPS protéiques extraites lors des séquences 1 et 3 du protocole d'extraction multi-méthodes.	115
Figure 79 : Profils chromatographiques sur colonne de gel filtration Protein K 804 des tailles d'EPS protéiques extraites lors des trois étapes de la séquence 1 du protocole d'extraction multi-méthodes.	117
Figure 80 : Chromatographie d'échange d'anions sur colonne SourceQ des EPS extraites à partir de granules et de boues floculées durant les trois étapes de la première séquence du protocole multi-méthode.	120
Figure 81 : Analyse par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 75 des EPS hautement anioniques extraites à partir des granules lors de l'étape US de la première séquence du protocole multi-méthodes et fractionnés par chromatographie d'échange anionique.	121
Figure 82 : Protocole utilisé pour les traitements enzymatiques des granules.	129
Figure 83 : Absorbances à 640 nm des phases SoMiT après 10 min de décantation des granules des réacteurs R1 et R2.	130
Figure 85 : Protocole de mesure de la résistance aux contraintes hydrodynamiques après traitement enzymatique.	133
Figure 86 : Distribution des diamètres des granules de la phase GrTHy prélevés après application de contraintes hydrodynamiques sur les granules des réacteurs R1 et R2 ayant subi des traitements enzymatiques et représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres pour les réacteurs R1 et R2.	135
Figure 87 : pourcentages massiques des matières volatiles totales contenues dans les phases SoTHy, MiTHy et MaTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques.	136
Figure 88 : Absorbances à 640 nm après décantation de 10 min des phases MiTHy + SoTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques.	137
Figure 89 : Taux de transferts de calcium dans les phases MiTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques.	139
Figure 90 : Images en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.	141
Figure 91 : Images vues en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.	142
Figure 92 : Protocole utilisé pour les traitements chimiques des granules.	146
Figure 93 : Absorbances à 640 nm phases SoMiT prélevées après traitements chimiques des granules des réacteurs R1 et R2.	147
Figure 94 : Taux de transfert de calcium dans les phases SoMit prélevées après traitements chimiques des granules des réacteurs R1 et R2.	148
Figure 95 : Distribution des diamètres des granules de la phase GrTHy prélevés après application de contraintes hydrodynamiques sur les granules des réacteurs R1 et R2 ayant subi des traitements chimiques et représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres pour les réacteurs R1 et R2.	149

Figure 96 : pourcentages massiques des matières volatiles totales contenues dans SoTHy, MiTHy et MaTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques	150
Figure 97 : Absorbances à 640 nm des phases SoTHy + MiTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques.....	150
Figure 98 : Taux de transfert de calcium dans phases MiTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques.....	151
Figure 99 : Images vues en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	152
Figure 100 : Images vues en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	154
Figure 101 : Modèle de structure de granule Aérobie étudié.	163
Figure 102 : Répartition globale des polysaccharides à résidus glucose ou mannose dans un granule de R1.	176
Figure 103 : Répartition globale des polysaccharides à résidus glucose ou mannose dans un granules de R1.	177
Figure 104 : Répartition globale des protéines dans un granule de R1.	178
Figure 105 : Répartition globale des protéines dans un granule de R1.	179
Figure 106 : Répartition des polysaccharides et micro-organismes dans un granule de R1 soumis à une contrainte hydrodynamique.....	180
Figure 107 : Répartition des polysaccharides et micro-organismes dans un granule de R1 soumis à une contrainte hydrodynamique. (.....	181
Figure 108 : Répartition des protéines et micro-organismes dans un granule de R1 soumis à une contrainte hydrodynamique.....	182
Figure 109 : Répartition des protéines et micro-organismes dans un granule de R1 soumis à une contrainte hydrodynamique.....	183
Figure 110 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	184
Figure 111 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	185
Figure 112 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	186
Figure 113 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	187
Figure 114 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	188
Figure 115 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	189
Figure 116 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	190
Figure 117 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques.....	191

Liste des tables

Table 1 : Comparaison des méthodes d'extraction des protéines (PN) et des polysaccharides (PS) de boues granulaires (mg g^{-1} MVS)	34
Table 2 : Plages de longueurs d'ondes d'infra rouges absorbées par les principaux groupements chimiques fonctionnels des EPS selon Comte et al. (2006).	38
Table 3 : Conditions d'alimentation des 2 réacteurs airlift (R1 et R2) utilisés dans notre étude (thèse de Ahlem Filali (2011)).	55
Table 4 : Séquences des sondes FISH utilisées. Les solutions de marquage AOB, NOB et Eub mix contiennent un mélange de sondes présentant les différentes séquences correspondantes.	61
Table 5 : Liste des enzymes utilisée pour les traitements des granules.....	65
Table 6 : Protéines utilisées pour l'étalonnage de la colonne de type ProtK804	76
Table 7 : Test de reproductibilité de la mesure de tailles de protéine effectuée par passage dans une colonne de type ProtK804.	77
Table 8: Mesure de tailles des volumes d'élution de protéines de tailles connues lors du passage dans une colonne Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare).	77
Table 9 : Propriétés des granules des réacteurs R1 et R2.	82
Table 10 : Comparaison des quantités d'EPS extraites lors des trois séquences d'extractions effectuées sur boues activées et granules par le protocole multi-méthodes de référence (thèse Monique Ras, LBAE, 2008).	103
Table 11 : Analyse des efficacités d'extraction des EPS des granules par les protocoles optimisés utilisant les ultrasons (protocole 1) et les billes de verre (protocole 2) au bout de 4 séquences d'extraction (EPS ₄ (exp)) et selon les calculs théoriques (EPS extractibles), A étant le coefficient d'épuisement déduit de ces calculs. Et évaluation de la capacité de fractionnement de ces protocoles entre les étapes chimiques mesurée à l'étape 1 et 2 (EPS ₁ (exp) et EPS ₂ (exp)).	110
Table 12 : Bilan des effets des digestions enzymatiques sur les granules.....	144
Table 13 : Bilan des effets des digestions enzymatiques sur les granules.....	156

Introduction :

Le traitement des eaux usées, et en particulier le traitement des eaux issues de l'agriculture et de l'industrie est aujourd'hui un enjeu très important pour l'environnement. En effet, les conséquences de la libération dans le milieu naturel de substances polluantes sont très nombreuses. L'opacification des eaux perturbe la photosynthèse et l'accumulation de particules colmate les milieux aquatiques et gêne la respiration des poissons. Les fortes concentrations en substances carbonées et azotées peuvent stimuler l'accumulation de boues et la production végétale (eutrophisation) ce qui peut conduire à l'asphyxie des milieux. Enfin, des problèmes sont liés à l'activité toxique de certaines substances (pesticides, médicaments, métaux lourds...).

Durant les dix dernières années, un certain nombre d'études ont été menées par différentes équipes de recherche afin d'explorer les possibilités offertes par les boues granulaires produites en réacteurs de type SBR (Réacteur Batch Séquencé) pour le traitement des eaux fortement polluées (Yilmaz et al., 2007). Les granules aérobies sont des agrégats bactériens utilisés dans le traitement des eaux usées qui se distinguent, par rapport aux autres types d'agrégats (et en particulier les floes) par une taille, une densité et une cohésion plus élevées. Ces propriétés physiques, obtenues grâce à l'imposition de certains paramètres environnementaux lors de la conduite du procédé, vont apporter aux granules un certain nombre d'atouts. Ces agrégats sont en effet particulièrement adaptés au traitement des eaux fortement concentrées produites notamment par l'industrie agroalimentaire. Leur densité élevée accélère les étapes de séparation solide liquide par décantation. Leur compacité permet de concentrer les activités épuratrices et ainsi de diminuer les dimensions des installations. En limitant les transferts de matière et notamment d'oxygène au sein du granule, cette compacité va également provoquer l'établissement de plusieurs microenvironnements localisés à différentes profondeurs dans les agrégats où vont se développer des populations bactériennes et des fonctionnalités épuratrices différentes. Dans le cadre du traitement des polluants azotés, cette particularité permettra notamment de réaliser simultanément les étapes de nitrification et de dénitrification. De Bruin et al., (2004) comparent les contraintes économiques imposées par l'utilisation de système d'épuration par boues activées floculantes et granulaires et estiment que les économies réalisées via l'utilisation de granules cultivés en SBR peuvent être de l'ordre de 7 à 17 % tout en maintenant des performances supérieures aux procédés dit classiques pour l'élimination de l'azote et du phosphore.

Les propriétés physiques des granules dépendent beaucoup de la structure de la matrice extracellulaire dans laquelle se développent les bactéries, structure qui est encore mal connue. D'après les études réalisées sur le sujet, la matrice des granules aérobies est majoritairement composée de Substances Polymériques Extracellulaires (EPS). Ces molécules sont issues de plusieurs sources, elles peuvent provenir de l'effluent traité, de lyses cellulaires naturelles ou peuvent être synthétisées puis excrétées par les microorganismes de l'agrégat. Au sein du granule, elles vont ensuite avoir plusieurs rôles. Certaines EPS vont constituer des réserves de nutriments pour les bactéries, et d'autres, de part leur activité enzymatique, vont permettre la dégradation extracellulaire de certaines substances. Enfin, selon les observations de plusieurs équipes de recherche, les EPS, en constituant un réseau entrecroisé compact vont assurer les propriétés physiques des granules.

L'enjeu majeur de cette thèse sera de chercher à mieux comprendre le lien entre les caractéristiques chimiques des EPS et les propriétés physiques des granules. Ce travail s'inscrit dans la continuité des activités de recherche menées au Laboratoire de Biotechnologies Agroalimentaire et Environnementale (LBAE) sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation et la structuration des agrégats bactériens. En effet, la stratégie et les méthodologies d'extraction et d'analyse des EPS développées par Monique Ras, au cours de sa thèse (LBAE, 2008) sur des floes ou biofilms ont été appliquées au cas des granules. Cette étape d'extraction constitue un préalable indispensable pour mener à bien l'étude des relations existant entre les propriétés chimiques et la fonction des EPS.

Cette étude s'inscrit également dans le cadre de la collaboration scientifique du LBAE avec l'équipe « Systèmes Microbiens et BioProcédés » du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP). Cette équipe s'intéresse au développement de nouveaux procédés biologiques d'épuration et étudie l'importance relative de différents facteurs sur le processus de granulation. Dans ce contexte, des réacteurs séquencés ont été utilisés afin de produire des boues granulaires aérobies capables de métaboliser la matière organique dissoute mais également de traiter les pollutions azotées et phosphorées (Thèse A. Filali et Thèse A. Mañas., LISBP, 2011). Ce sont ces agrégats qui ont servi de matrices biologiques pour notre étude.

Après une étude bibliographique des différents travaux réalisés sur l'étude des granules et de leurs propriétés microbiologiques, physiques ou chimiques, nous détaillerons les méthodes expérimentales utilisées puis nous aborderons les résultats obtenus.

En premier lieu, après avoir décrit les conditions de production des boues granulaires en réacteur, nous caractériserons les agrégats étudiés et en particulier leurs propriétés épuratrices ainsi que leur degré de résistance aux contraintes physiques. Il conviendra ensuite d'identifier la nature des polymères présents soit après leur extraction de la matrice granulaire soit par marquage *in situ* et observation en microscopie confocale.

L'objectif sera ensuite de caractériser plus finement ces EPS afin de déterminer quelles propriétés physico-chimiques peuvent intervenir dans la formation et le maintien d'un état fortement agrégé. En particulier, nous rechercherons quels types d'interactions chimiques relient les polymères et contribuent à la cohésion de la matrice et à sa résistance aux contraintes.

Chapitre 1 : Recherche bibliographique

I. Les procédés de traitement des eaux par voie biologique

I.1. Procédés par boues activées

Les stations d'épuration (STEP) fonctionnent grâce à sont une succession d'opérations unitaires de traitement des eaux. A leur arrivée à la station, les eaux usées subissent un dégrillage qui consiste à retenir sur une grille les objets encombrants. Elles sont alors acheminées vers un dessableur/déshuileur, ouvrage dans lequel sont éliminées les grosses particules par décantation et les graisses par insufflation d'air et raclage en surface.

Lors de cette étape préliminaire, environ 20% de la matière organique est éliminée, notamment celle adsorbée sur le sable. Un traitement secondaire, ou traitement biologique aérobie, assure d'une part la métabolisation de la matière organique carbonée et, d'autre part, permet la séparation de la matière solide en excès (boues) et de l'eau épurée par une étape de décantation (ou clarification) (Figure 1). Dans le cas où le rejet des eaux s'effectue dans des zones sensibles (lacs ou rivières à faible débit), un traitement biologique de dénitrification ou de déphosphatation doit être mis en place en tant que traitement tertiaire (Loi du 21 Avril 2004 portant sur la transposition de la directive cadre sur l'eau (DCE) du 23 octobre 2000).

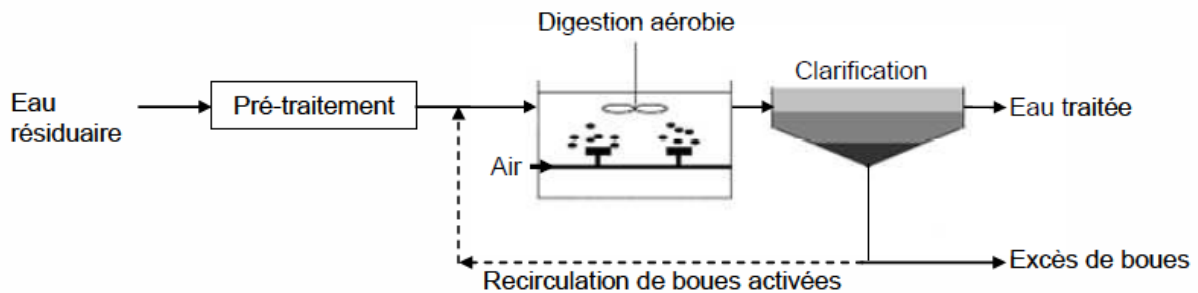


Figure 1 : Principe de fonctionnement d'une station d'épuration par voie biologique à boues activées.

Les boues qui proviennent des traitements primaires, secondaires et tertiaires représentent une production moyenne de 80 à 100 g Matière Sèche Totale (MST) Equivalent Habitant (Eq.Hab.)⁻¹. j⁻¹ pour une STEP conventionnelle (Boëglin, 1998). Une station d'épuration d'une capacité de 500 000 Eq. Hab. produirait donc entre 40 et 50 tonnes de MST par jour. Une fraction de cette production est réinjectée dans les bassins d'aération (boues activées) mais l'excès doit être évacué et traité (procédés de réduction des boues), épandu sur des terres agricoles ou éventuellement stocké.

Les boues activées réintroduites dans les bassins d'aération représentent un apport de biomasse épuratrice sous forme d'agrégats bactériens en suspension appelés flocs (Figure 2).

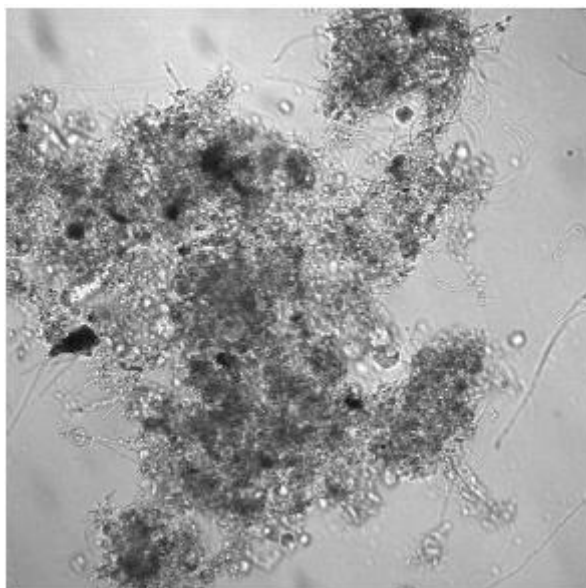


Figure 2 : Image d'un floc bactérien issu d'un bassin d'aération de station d'épuration.

La séparation des eaux épurées de la biomasse résiduelle repose sur les étapes de biofloculation et de décantation de ces flocs bactériens dans les bassins de clarification. Afin d'accélérer ce processus, l'ajout d'agents flocculants ou d'adjuvants tels que des sels métalliques (chlorure ferrique ou d'aluminium) est parfois effectué.

Le principe fondamental du traitement des eaux repose d'une part, sur le procédé de dégradation biologique et d'autre part, sur la séparation physique de la biomasse épuratrice et de l'eau épurée. Ces deux étapes peuvent être mises en œuvre successivement dans les bassins classiquement retrouvés en STEP ou simultanément dans les Réacteurs Séquencés en Batch (SBR).

I.2. Procédés par biomasse fixée

Les bioréacteurs à membranes couplent la dégradation biologique à une séparation par ultra ou microfiltration. Ce traitement consiste à injecter l'eau à épurer dans un réacteur ou bassin dans lequel s'opère une première dégradation biologique. L'apport de la biomasse épuratrice dans ce bassin se fait par l'intermédiaire d'agrégats bactériens (Visvanathan et al., 2000). Le module membranaire peut se situer à l'extérieur (Bioréacteur A Membrane Emergée ou BAME, Figure 3) ou à l'intérieur de ce bassin (Bioréacteur A Membrane Immergée ou BAMI).

Par un système de surpression (pour les BAME) ou de dépression (pour les BAMI) de part et d'autre de la membrane, le flux d'eau partiellement traitée va traverser la membrane par filtration en laissant du côté filtrant un concentré de bactéries et de matières organiques et inorganiques. Ce retentât est ensuite réinjecté dans le bassin où il peut continuer à être dégradé.

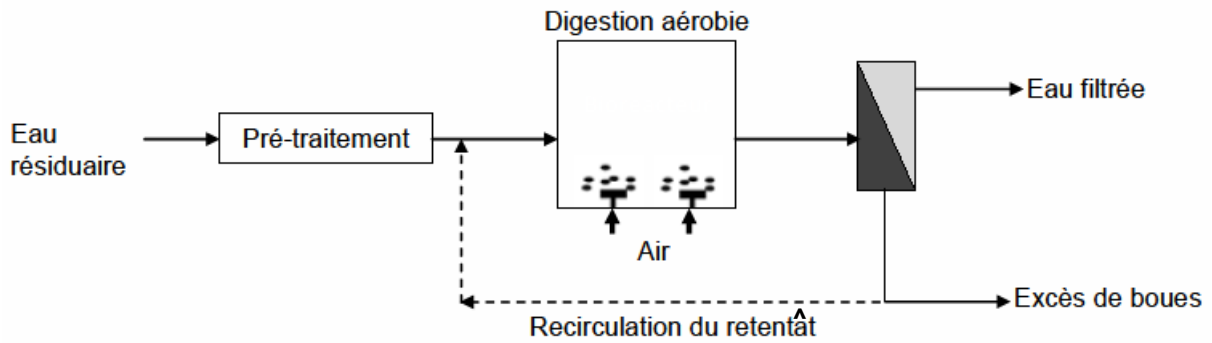


Figure 3 : Principe de fonctionnement d'un bioréacteur à membrane émergée.

La liqueur mixte que représente l'effluent apporte des cellules, des particules et des molécules (organiques et inorganiques) qui vont adhérer à la surface membranaire par différentes forces et interactions chimiques. Ce dépôt forme une deuxième couche filtrante dont la taille des pores est inférieure à celle des pores des membranes et qui permet l'adhésion et le développement de colonies bactériennes sous forme de biofilms (Apilánez et al., 1998).

Le biofilm des bioréacteurs à membranes contribue à séparer les phases liquide et solide en apportant un potentiel de dégradation biologique supplémentaire. En effet, la matière solide est retenue par le biofilm alors que la matière dissoute diffuse à travers le biofilm et sera consommée par les bactéries épuratrices fixées à la membrane.

I.3. Activité biologique et épuration

I.3.1 Rôle des bactéries

Le traitement des effluents urbains par voie biologique consiste à dégrader la pollution organique via la recirculation d'une biomasse concentrée et active (ou boues activées). Le rendement épuratoire des STEP de cette charge organique est généralement d'au moins 80% selon les réglementations en vigueur et selon les configurations du traitement biologique (Gaudy et Gaudy, 1980).

L'analyse microbiologique de ces boues a démontré qu'elles sont essentiellement composées de bactéries épuratrices et de matières inertes (non biodégradables). Cette population microbienne est notamment responsable de l'hydrolyse de la matière organique et inorganique (azote, phosphore) apportée par l'effluent (Madoni et al., 2000). Elle convertit la charge organique, parfois également azotée et phosphorée, d'une eau polluée et tire l'énergie, via ses voies respiratoires, pour assurer sa croissance cellulaire et pour synthétiser de la matière de réserve sous forme de Substances Polymériques Extracellulaires (Extracellular Polymeric Substances, EPS). Ces substances peuvent aussi servir de matrice protectrice en entourant les bactéries et en limitant les échanges avec l'extérieur (Figure 4).

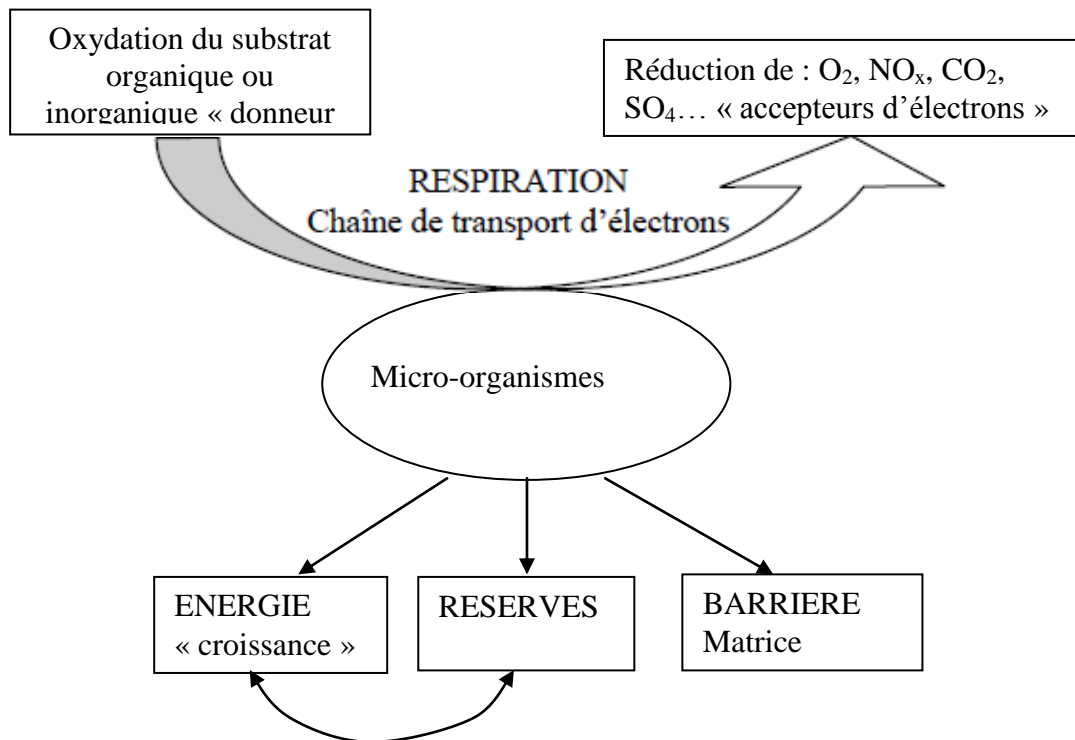


Figure 4 : Digestion et/ou mise en réserve ou excrétion de la matière organique par les bactéries.

I.3.2. Elimination de l'azote : compétition entre hétérotrophes et autotrophes

La directive européenne 91/271 du 21/05/91 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires impose, d'ici 2012, l'élimination de la pollution azotée et phosphorée pour des stations d'épuration d'une taille supérieure à 2000 équivalents habitants. La mise en place des traitements tertiaires pourra réduire la pollution azotée en provenance des eaux usées municipales.

Cependant, l'apport d'ammonium par les lisiers de porcs ainsi que celui de nitrates par les activités agricoles représentent aussi des sources importantes de pollution à l'azote dans l'environnement qui ne sont pas toujours réglementées.

En 2002, la France a enfoui 48,3 % des déchets ménagers en décharge, soit 22,9 millions de tonnes ((rapport ITOM) ADEME, 2006). Les lixiviats obtenus au cours du stockage sont récupérés et remis en circulation dans les déchets afin d'optimiser la dégradation des fractions organiques. Cependant, en raison des conditions anaérobies au cours du stockage, l'ammonium ne peut être transformé et s'accumule dans ces lixiviats, ce qui représente un apport concentré d'azote devant être traité avant le rejet dans l'environnement. Face à l'intensification des lois régissant la qualité des eaux, le secteur industriel doit mettre au point et optimiser le traitement de l'azote, généralement effectué par deux étapes successives : une étape de nitrification et une étape de dénitrification.

La nitrification correspond à l'oxydation de l'ammoniac (NH_4^+) en nitrites (NO_2^-) par des bactéries oxydant l'ammonium (AOB) puis en nitrates (NO_3^-) par des bactéries oxydant les nitrites (NOB). Ces étapes sont réalisées en présence d'oxygène (milieu aérobie). Les bactéries (aussi bien AOB que NOB) les réalisant sont autotrophes (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*), et utilisent donc uniquement des sources de carbone et d'énergie d'origine minérale pour leur croissance, et seulement en présence d'oxygène (Wanner, 1994, figure 6).

Les nitrates sont eux convertis en azote gazeux (N_2) via la dénitrification en milieu exempt d'oxygène (milieu anoxie) et en présence d'une source carbonée organique. En effet, les microorganismes responsables de cette étape (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*) sont hétérotrophes et peuvent se développer à partir de carbone organique en présence d'oxygène, mais, en milieu anoxique, ils peuvent également utiliser les formes oxydées de l'azote comme accepteurs d'électrons (Boëglin, 1998) (Figure 5). Cette étape doit donc impérativement avoir lieu dans un milieu où l'oxygène est limitant.

Le procédé d'élimination de l'ammonium consiste donc à basculer d'un milieu aérobie à un milieu anoxie afin d'assurer successivement les étapes de nitrification par les AOB et les NOB autotrophes en présence d'oxygène, puis de dénitrification par les organismes hétérotrophes.

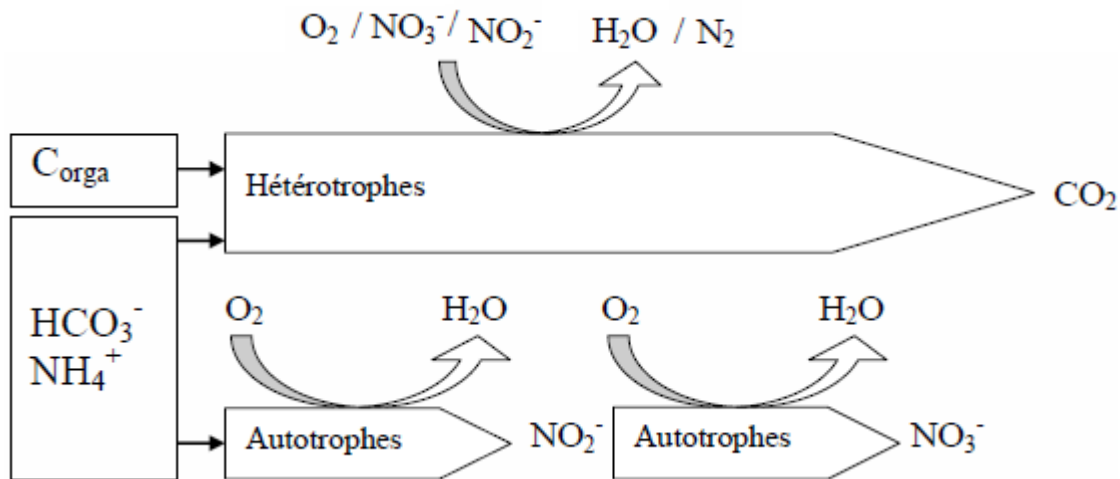


Figure 5 : Représentation des substrats et produits issus de la croissance des populations bactériennes hétérotrophes et autotrophes.

Dans un même milieu, les autotrophes nitrifiants se retrouvent en compétition avec les hétérotrophes aérobies pour l'espace et pour l'oxygène, qu'ils ont en commun en tant qu'accepteur d'électrons (Elenter et al., 2007). L'avantage des hétérotrophes est leur croissance rapide en condition aérobie (taux de croissance maximum μ_{max} de 6 j^{-1} pour *Acinetobacter calcoaceticus*) par rapport à celle des nitrifiants (2 j^{-1} pour *Nocardia amarae*), (Kim et Pagilla, 2000). Cependant, lorsque le substrat organique vient à manquer, les populations autotrophes peuvent se retrouver en situation avantageuse.

Les hétérotrophes sont donc les premiers organismes à se développer et à tirer avantage des substrats nutritifs du milieu, ce qui explique, en partie, la difficulté à installer des populations nitrifiantes dans un consortium bactérien.

Afin de contourner ce problème, l'élimination de l'azote est classiquement réalisée via un procédé continu en deux étapes dans deux bassins séparés (Figure 6) (Metcalf and Eddy, 1991). La seconde étape, c'est-à-dire l'étape anoxique de conversion des nitrates et nitrites en N_2 par les bactéries hétérotrophes nécessite un apport externe de substrat organique (ou demande chimique en oxygène (COD)) en temps que donneur d'électrons. Pour cette raison, deux possibilités sont envisageables. L'installation notée A sur la figure 6 permet d'utiliser la COD présente dans les eaux résiduelles pour cette étape de dénitrification. Auquel cas, celle-ci devra avoir lieu avant l'étape de nitrification (prédénitrification). Cette configuration est nécessaire pour que la quantité de COD suffise à assurer une dénitrification complète. Les Nitrates produits lors de l'étape de nitrification sont retransférés au réacteur de dénitrification via un flux de recyclage. Dans l'installation notée B (figure 6), la dénitrification se fait après la nitrification et est alimentée en COD via une source externe.

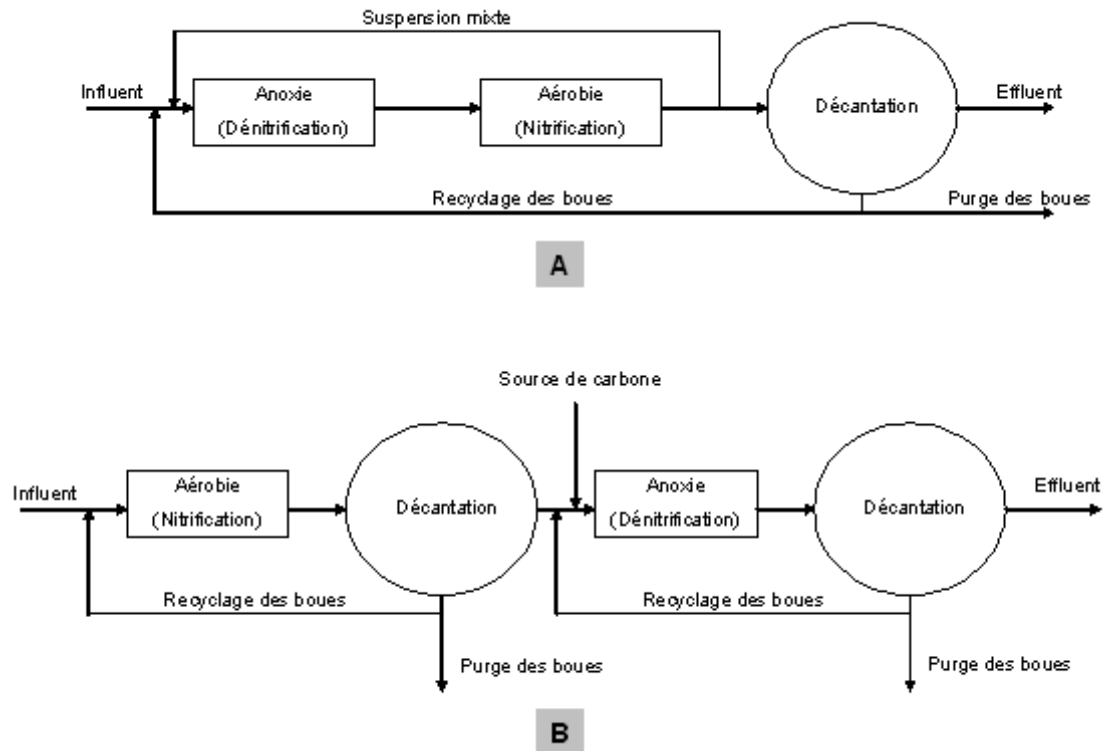


Figure 6 : Exemples de configurations des procédés à boues activées traitant l'azote. A : procédé bi-étagé et à boue unique ; B : procédé bi-étagé à boues séparées (Metcalf and Eddy, 1991)

Cependant, lorsque la concentration en oxygène est faible, il a été observé que ces deux étapes peuvent être réalisées en une seule, par une même boue (Münch et al., 1996 ; Fuerhacker et al., 2000). Ce phénomène repose sur la formation d'une zone anoxique au centre de l'agrégat provoquée par la limitation du transfert d'oxygène. Au sein de la zone aérobie les bactéries autotrophes consomment l'oxygène et réalisent la nitrification. Dans la zone anoxique, au centre des floccs, les bactéries hétérotrophes utilisent les nitrites et nitrates produit dans la zone aérobie comme accepteurs finals d'électrons réalisant ainsi la dénitrification (Wan, 2009).

Afin d'améliorer encore le procédé, il est également possible de bloquer la nitrification au stade nitrite afin que la dénitrification réduise directement les nitrites accumulés sans passer par le stade nitrate. Cette nitrification et dénitrification via les nitrites est appelée le « shunt des nitrates » (figure 7). Elle peut être réalisée en inhibant ou en éliminant les populations de NOB. Les avantages du shunt des nitrates sont une baisse de 25 % de la consommation d'oxygène au cours de l'étape de nitrification ce qui réduit d'autant la dépense d'énergie liée à l'aération des boues et une réduction de 40 % des besoins en COD pour l'étape de dénitrification. Le taux de dénitrification est également plus important et la production de boues est réduite.

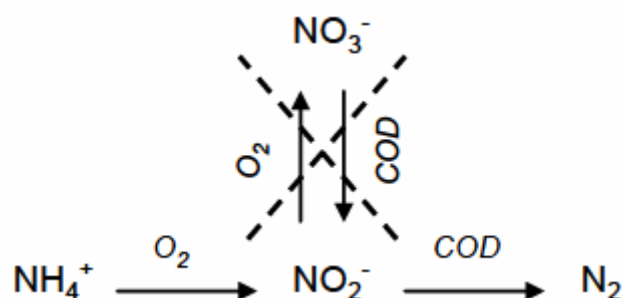


Figure 7 : Le shunt des nitrates.

I.4. Problématiques et enjeux des agrégats biologiques

Les procédés d'épuration des eaux usées et en particulier la phase de dépollution par les agrégats bactériens sont fonctionnels et parviennent à l'heure actuelle à s'aligner sur les réglementations en vigueur. Cependant, ces procédés imposent un certain nombre de contraintes qui peuvent justifier des optimisations.

A la suite du procédé d'épuration, les boues doivent être stockées et subir des traitements car il n'est pas possible de les rejeter en l'état dans la nature. La réduction des volumes produits est une solution pour faciliter la gestion de ce problème.

Le procédé de traitement utilisé doit également garantir la réalisation complète de la nitrification et la dénitrification. Le recours au shunt des nitrates permet de réduire les coûts énergétiques.

Dans ce cadre, la solution envisagée est l'utilisation d'agrégats plus compacts, tout d'abord plus faciles à stocker et dans lesquels les limitations de transfert d'oxygène sont favorables à l'instauration d'une zone centrale anoxique dans laquelle la dénitrification peut s'effectuer parallèlement à la nitrification. Ces agrégats bactériens dont la compacité confère des propriétés très particulières sont nommés granules.

I.5. Traitement des eaux usées par les granules aérobies

Un certain nombre d'études a déjà été mené afin de montrer le potentiel des boues granulaires produites en réacteurs SBR pour le traitement des eaux fortement polluées. Ainsi, Yilmaz et al. (2007) utilisent ce procédé et éliminent avec succès les pollutions azotées (NH_4^+) et phosphorées (PO_4^{3-}) des effluents synthétiques testés. Cette même équipe utilise également les granules pour traiter, avec succès, l'azote et le phosphate issus d'effluents naturels d'abattoir et met en évidence l'importance de souches d'*Accumulibacter* à la fois pour les étapes de dénitrification et d'élimination du phosphate. Le traitement des eaux utilisant les granules peut également permettre l'élimination de métaux lourds (Liu et al., 2003), ou de teinture (Zheng et al., 2005).

Au cours de sa thèse, Junfeng Wan génère une boue granulaire à partir de boues flocculantes issues d'une station d'épuration des eaux municipales (Labège (31)). Pour cela, les boues sont cultivées en réacteurs SBR de 2,5 L et agitées par un flux d'air ascendant. Les réacteurs sont alimentés par des eaux usées synthétiques. Un mélange de glucose (25 %), éthanol (25 %), propionate de sodium (25 %), acétate (25 %) est utilisé comme source de carbone de manière à ajuster la COD entre 750 et 1000 mg.L^{-1} . L'alimentation en azote est assurée par l'ajout de NH_4 à une concentration allant de 37,5 à 50 mg N.L^{-1} de manière à maintenir un rapport COD/N de 20 (Wan et al., 2011).

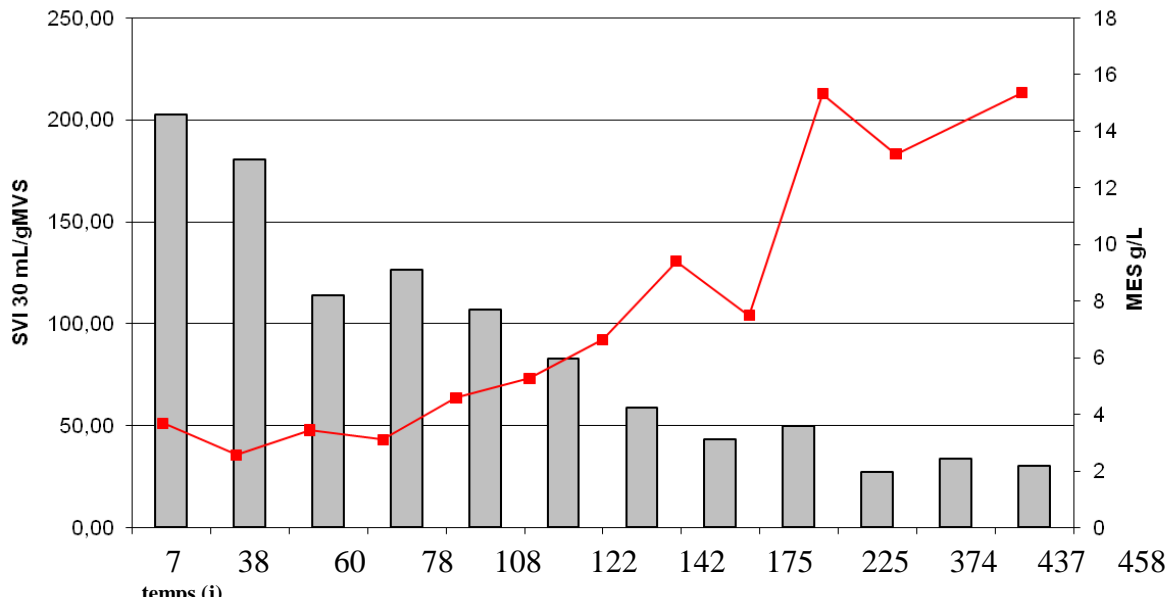


Figure 8 : Exemple d'évolution des MES (■) et SVI30 (barres grises) au cours de la granulation.

La figure 8 montre, la granulation progressive de la boue initialement floculante s'est accompagnée d'une augmentation très importante des Matières En Suspension ou MES (augmentation d'environ 320 %), et d'une baisse très importante du SVI₃₀ (diminution d'environ 80 %).

Le « Sludge Volume Index » (ou SVI), représente la compacité des boues (exprimée en mL.g⁻¹ boue) après un temps donné de décantation (SVI 5 ou SVI 30 après 5 ou 30 min de décantation respectivement). Il constitue un moyen de mesurer la densité des agrégats. Un SVI bas, correspond à une densité et une compacité importante des agrégats. Par conséquent, les agrégats de types granulaires sont caractérisés par des valeurs faibles de SVI.

La boue granulaire ainsi obtenue est capable de métaboliser la matière organique dissoute (COD) mais également l'ammoniac (NH₄⁺) ainsi que les nitrates et les nitrites (NO₃⁻ et NO₂⁻) et offre les avantages liés à l'augmentation de densité des granules. Notamment, comme en atteste la mesure des SVI, la décantation est très rapide et la concentration en biomasse est élevée.

II. Les granules bactériens aérobie : organisation et propriétés fonctionnelles

II.1. Définition et intérêts

Les granules sont des agrégats bactériens en suspension comparables aux floccs, mais de structure plus homogène, arrondie et compacte (figure 9). De Kreuk et al. (2007) définissent plus précisément les granules de boues activées aérobie comme des agrégats d'origine microbienne qui ne coagulent pas lorsqu'ils sont soumis à un stress hydrodynamique faible et qui décantent significativement plus vite que les floccs. L'observation microscopique d'un granule montre une organisation biologique complexe (comparable à celle d'un flocc) avec une communauté bactérienne enchevêtrée dans une matrice très dense constituée de Substances Polymériques Extracellulaires (ou EPS) (Lemaire et al., 2008a).

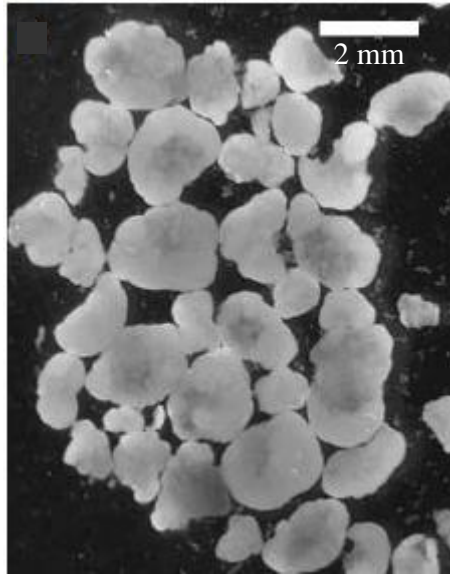


Figure 9 : Image de granules vus au microscope optique

Toujours d'après cette même étude, on distingue cinq paramètres devant être respectés afin de pouvoir considérer une boue aérobie comme granulaire :

- Les agrégats doivent contenir effectivement des microorganismes « actifs »
- Ils ne doivent pas re-coaguler lorsqu'ils sont soumis à des contraintes de cisaillement réduites
- Leur temps de décantation est inférieur à ceux des floccs
- Ils dépassent tous un diamètre minimal qui varie selon le type d'installation
- Ils peuvent être séparés des floccs par tamisage

Ce sont ces propriétés qui vont conférer aux granules un certain nombre d'atouts pour le retraitement des eaux usées.

Tout d'abord, l'augmentation de la concentration en biomasse permet de diminuer les volumes de boues produites et donc de réduire les dimensions des installations et de limiter les problèmes de stockage et de retraitement des boues. Les agrégats sont également plus résistants que des floccs. Les temps de décantation réduits permettent d'accélérer l'étape de séparation solide liquide. Le granule est une forme adaptée au traitement des eaux fortement chargées en pollution organique.

En outre, la compacité importante de ces agrégats va être un facteur limitant pour les transferts de substrat et d'oxygène vers le centre des granules. Les conditions de cultures en surface seront donc différentes de celles à différents niveaux de profondeurs. L'extérieur des agrégats sera donc colonisé par des microorganismes très performants en présence d'un fort taux d'oxygène et de nutriments en abondance alors que les parties internes seront peuplées par des bactéries adaptées aux milieux carencés ou métabolisant les déchets produits d'autres organismes. Ceci va générer une certaine compartimentation des granules qui vont ainsi accueillir une plus grande variété de microorganismes métabolisant un plus grand panel de polluants en une seule étape. En particulier, dans le cadre du traitement de l'azote, on pourra beaucoup plus facilement obtenir un développement de population nitrifiantes aérobies en surface et de populations hétérotrophe en profondeur se développant en condition anoxique, utilisant les nitrates produits dans les compartiments aérobies comme accepteurs finals d'électron ce qui permet ainsi l'établissement de la dénitrification et de la nitrification en une seule étape.

II.2. Les facteurs favorables à la granulation

Le passage des agrégats bactériens de l'état de floccs à celui de granules est suivi principalement via l'évolution de trois indices :

- **La matière en suspension (MES)** qui représente la masse totale de matériel solide contenu dans une unité de volume de milieu liquide.
- **La matière volatile en suspension (MVS)** qui correspond à la part organique des MES
- **L'indice de boue (SVI pour « Sludge Volume Index »)** qui désigne le volume occupé par les agrégats après un temps donné de décantation et mesure donc leur densité

En augmentant les contraintes hydrodynamiques (érosion) au cours de la croissance des floccs, Tay et al. (2001a), mettent en évidence une évolution de leur structure agrégée, d'un état diffus et hétérogène vers celui de granules denses et homogènes. Cette modification de structure s'accompagne d'une augmentation de la compacité des agrégats qui se traduit par une diminution du SVI (Sludge Volume Index) de 200 à 50 mL.g⁻¹, respectivement (Figure 10). Les contraintes hydrodynamiques sont donc un paramètre important pour la formation de granules (Liu et Tay, 2002). En effet, l'érosion progressive de la couche extérieure dispersive du floc permet de structurer l'agrégat en forme arrondie tout en conservant la partie intérieure dense (Sheng, 2006).

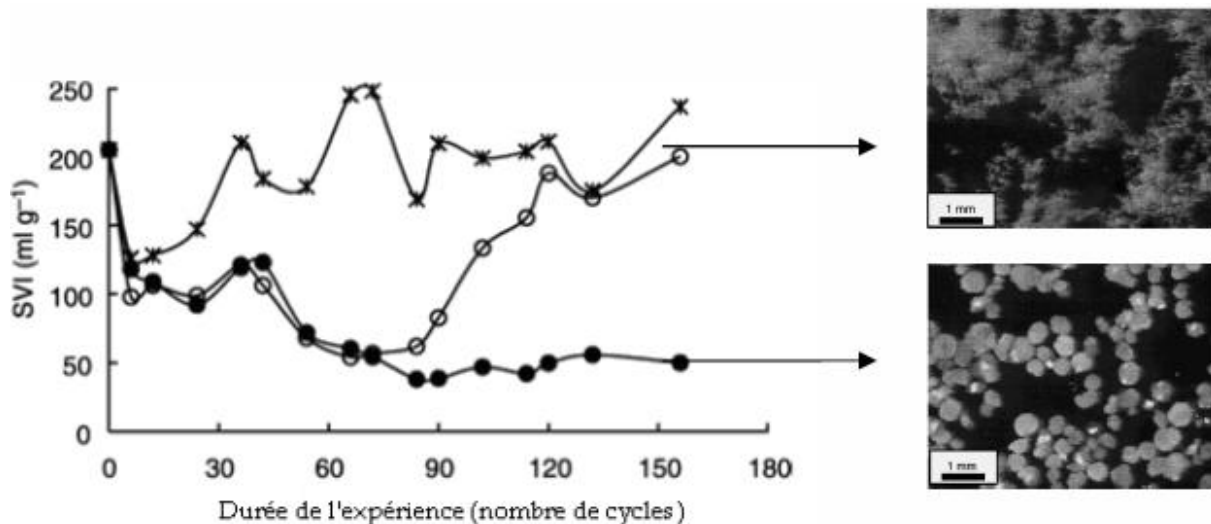


Figure 10 : Evolution du SVI des boues activées aérobies au cours du temps pour trois conditions hydrodynamiques. L'agitation dans les réacteurs est générée par un flux d'air ascendant. On compare les effets du débit sur les floccs. x : 0,5 L.min⁻¹, ● : 2 L.min⁻¹, ○ : 4 L.min⁻¹. Les images microscopiques illustrent l'état des floccs à la fin de l'expérience pour un débit d'air de 0,5 L.min⁻¹ (image du haut) et pour un débit d'air de 4 L.min⁻¹ (image du bas), (Tay et al., 2001b).

La densification des floccs en granules a lieu dans des conditions environnementales particulières. Tay et al. (2001a) ont montré que l'acétate, déjà mentionné comme substrat stimulant le développement des bactéries non-filamenteuses, permet d'atteindre plus rapidement l'état de biogranules qu'une alimentation en glucose.

D'une manière générale, comme le soulignent de Kreuk et al (2007) l'apparition d'une structure granulaire repose sur la sélection de microorganismes favorables à la densification des agrégats. Parmi ces organismes, on trouve des organismes accumulateurs de phosphate ou de glycogène, ainsi que des bactéries nitrifiantes ou dénitrifiantes (De Kreuk and van Loosdrecht, 2004 ; Liu et al., 2004a ; Wan et Sperandio 2009). De nombreuses études démontrent que l'alternance dans le réacteur de phases d'alimentation en substrat et de famine favorise le stockage de composés intracellulaires de réserve produits pendant les périodes d'excès et consommés pendant les famines. Ce phénomène favorise la formation de granules et limite le développement de populations de bactéries filamenteuses incapables de stocker des quantités importantes de substrat de réserve (Beun et al., 1998 ; Li et al., 2006). Des microorganismes à faibles taux de croissance et producteurs de substances polymériques extracellulaires ont également été rapportés comme favorables à la granulation (Liu et al., 2004b ; McSwain et al., 2005). L'établissement d'un gradient de substrat au sein de l'agrégat semble aussi être un facteur important pour la granulation (Wan et Sperandio 2009).

Enfin, en imposant des temps de décantation courts au sein des réacteurs SBR, on sélectionne spécifiquement les granules par rapport aux floccs accélérant ainsi encore d'avantage la transition entre les deux types d'agrégats (Beun et al., 2002 ; Qin et al., 2004).

II.3. Propriétés microbiologiques des granules

Comme dit précédemment, les microorganismes sont un élément déterminant dans la composition d'un granule. Tout d'abord, il est précisé dans la définition même de l'agrégat granulaire que ce dernier doit contenir des microorganismes « actifs ». Ceux-ci sont à l'origine de la formation de la majeure partie de la matrice d'EPS et sont responsables des activités dépolluantes des agrégats (Lemaire et al., 2008b ; Wanner, 1994 ; Boëglin, 1998).

Les études qui ont été menées sur les boues granulaires donnent peu d'informations sur les rôles des microorganismes. Cependant on peut estimer que l'activité des microorganismes dans ce type d'agrégats, est comparable à celle observée dans des boues de type flocculante.

Dans le cas des floccs, l'influence de la nature des microorganismes sur les propriétés des agrégats a été étudiée via des variations dans l'alimentation et l'aération ou encore via l'addition de composés chimiques inhibant l'activité des microorganismes. En effet, le basculement des conditions de croissance aérobies (O_2 à 2 mg.L^{-1}) à un apport plus faible en oxygène ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) entraîne une déstructuration des floccs avec une augmentation d'un facteur cinq de la turbidité du surnageant (Wilén et Balmér, 1999).

L'inhibition du métabolisme bactérien, par abaissement de la température et ajout de chloramphénicol, affecte l'intégrité de la structure du flocc de manière similaire aux conditions anaérobies, ce qui montre que le métabolisme bactérien participe activement à la structure du flocc (Wilén et al., 2000). Cependant, une partie de la masse dispersée peut refloculer lorsque les conditions d'aération sont rétablies. Le processus de floculation et défloculation s'effectue donc de manière dynamique avec une forte implication de l'activité bactérienne.

La nature de l'alimentation peut également influencer la structure des agrégats bactériens. Certaines bactéries filamenteuses aérobies, telles que *Sphaerotilus natans*, prolifèrent dans un milieu alimenté en glucose (Kämpfer et al., 1995) et confèrent aux floccs une structure poreuse et hétérogène (Wilén et Balmér, 1999).

D'autre part, le rapport Carbone sur Azote (C/N) a sans doute un impact direct sur les compétitions entre différentes bactéries. Une alimentation riche en Azote (et donc un rapport C/N faible) semble avantager les organismes dénitrifiants qui utilisent les nitrates comme accepteurs finaux d'électrons, Durmaz et Sanin (2001) montrent, en effet, l'impact important de ce rapport sur les caractéristiques de leurs agrégats floculants. Lors de leur étude, ils constatent qu'avec un rapport C/N fort, ils obtiennent des flocs dont la matrice d'EPS est riche en polysaccharides, alors qu'avec un rapport C/N faible, et donc une alimentation riche en azote, c'est la production de protéines qui est favorisée.

Cette importance capitale de la nature des microorganismes se développant au sein des agrégats démontre la nécessité de maîtriser ce paramètre pour la mise en place du procédé d'épuration des eaux usées et notamment de maîtriser les mécanismes de compétition entre les différentes souches de microorganismes. Ces mécanismes de compétition ont été étudiés afin de tenter de prévoir quelles seront les espèces qui se développeront dans des conditions données. Les espèces microbiennes des granules peuvent être en compétition pour l'espace disponible, pour les différents substrats (carbone, azote sous différentes formes) et pour l'oxygène et les mieux adaptées aux propriétés de l'agrégat en constitueront les populations majoritaires.

Afin de décrire les comportements des organismes face à un paramètre environnemental, on distingue deux stratégies distinctes nommées « r » et « K ». Ces deux stratégies dépendent de l'affinité du microorganisme pour le substrat considéré. La stratégie « r » correspond à une faible affinité pour le substrat mais à un fort taux de croissance maximum (μ_{\max}) et la stratégie « K » correspond à une forte affinité pour le substrat et un faible taux de croissance maximal. Par conséquent, les fortes concentrations en substrat favoriseront les stratégies « r » qui attendront leur μ_{\max} élevé. Ce phénomène est facile à visualiser via le tracer de μ (taux de croissance) en fonction de C_s (concentration du substrat considéré) qui sont déterminées expérimentalement. Les organismes à stratégie « K » pour un substrat seront avantagés par des concentrations faibles en substrat (figure 11).

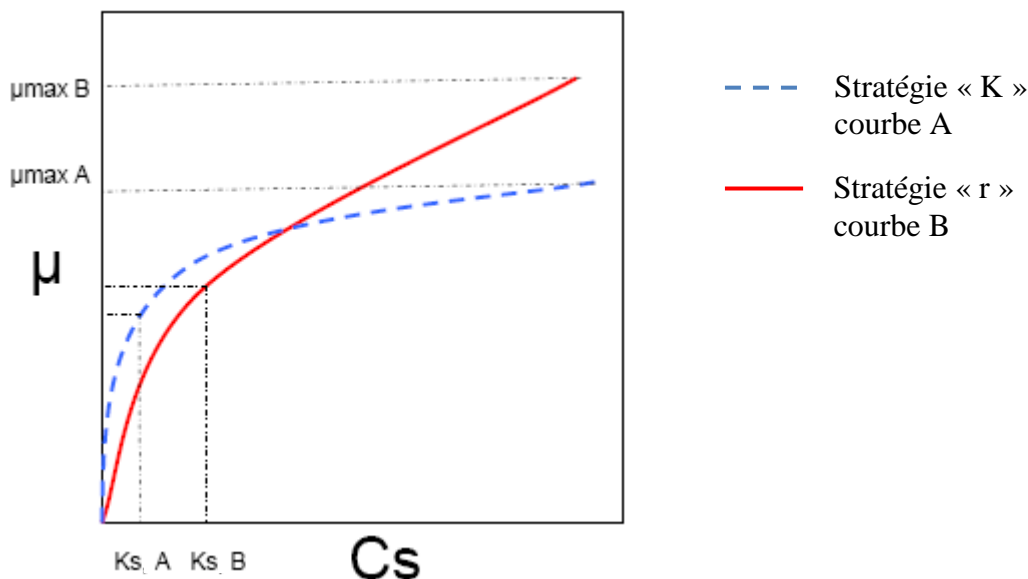


Figure 11 : Relations entre les taux de croissance spécifiques maximums et la concentration en substrat pour deux microorganismes à stratégie « K » (courbe A, forte affinité pour le substrat) et « r » (courbe B, fort taux de croissance). Les valeurs de K_{sA} et K_{sB} correspondent aux constantes de Monod des courbes de croissance A et B. Sa valeur correspond à la concentration en substrat pour laquelle $\mu = \mu_{\max}$.

Ainsi, au sein des parties internes des granules, le facteur limitant est la faible concentration en substrat et en oxygène, donc la stratégie la plus efficace est celle imposée par les microorganismes capables de se développer à des concentrations très faibles en substrat (stratégie « K »). A l'inverse, en périphérie des agrégats, la concentration en substrats est forte mais il y a des éliminations de cellules dues à l'érosion qui doivent être compensées par un taux de croissance élevé. La stratégie la plus efficace est donc la stratégie « r ». Ceci explique la répartition des bactéries autotrophes des granules employant une stratégie « r » par rapport à l'oxygène : ces dernières se développent en surface alors que les bactéries hétérotrophes à la stratégie « K » vont être retrouvées en profondeur. Lemaire et al. (2008 a et b) observent effectivement une stratification de cette sorte en effectuant, sur des coupes de granules, un marquage FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), une technique de marquage par hybridation sur des portions d'ARN ribosomiaux spécifiques d'une ou plusieurs espèces microbiennes choisies.

Lemaire et al., 2008b, observent l'organisation et la répartition des microorganismes dans leurs granules aérobies alimentés par des eaux résiduaires synthétiques dotées d'une DCO de 350 mg.L⁻¹ (acétate), et d'une concentration en ammonium de 35 mg.L⁻¹ et de phosphate 23 mg.L⁻¹. Selon leurs observations effectuées sur 24 granules de tailles variables, les bactéries *Accumulibacter* spp., des accumulateurs de polyphosphates strictement aérobies et à croissance rapide, sont localisées de manière dominante en périphérie de granules, dans les 200 premiers µm à partir de la surface, là où la concentration en dioxygène est la plus haute. *Comptibacter* spp. quant à elles, sont dominantes à partir de 200 µm de profondeur car elles sont capables d'adopter un métabolisme anaérobie.

Cette même équipe, observent la distribution des bactéries dans d'autres granules alimentés par des eaux résiduaires d'abattoirs dotés d'une DCO de 1420 mg.L⁻¹, et d'une concentration en ammonium de 240 mg.L⁻¹ et de phosphate 40 mg.L⁻¹ (Lemaire et al., 2008a). Ils notent en particulier que les bactéries oxydant l'ammonium (AOB), et au métabolisme strictement aérobie, n'ont pas seulement colonisé les 200 premiers µm à partir de la surface des granules. Une présence non négligeable d'AOB a été retrouvée à proximité de canaux parcourant les granules et constituant des poches d'oxygène au sein des agrégats.

Les caractéristiques physico-chimiques des agrégats sont donc très fortement impliquées dans la sélection d'organismes par rapport à d'autres. L'implantation ou non de certaines bactéries dans un granule peut dépendre de la résistance de l'agrégat face aux contraintes de cisaillement ou de la densité de la matrice d'EPS qui va être à l'origine de limitation de transferts de matières. La maîtrise d'un procédé de dépollution utilisant les granules exigera donc la compréhension des phénomènes contrôlant ces paramètres.

II.4. Propriétés physico-chimiques et densification des granules

Un certain nombre d'études effectuées sur les granules conduisent à penser que les EPS contribuent fortement au maintien de la structure des agrégats. En effet, la concentration de ces polymères, peut atteindre jusqu'à 600 mg par g de MVS dans des granules alimentés par de l'eau usée synthétique présentant un rapport C/N de 1,4 (Adav and Lee, 2008). De plus, leur composition est marquée par une variabilité importante (protéines, polysaccharides, substances humiques « like »...), qui va s'accompagner d'une grande diversité de leurs propriétés biochimiques (hydrophobicité, charge).

Grâce à cette diversité importante, les EPS pourront être impliquées dans différents types d'interactions à l'intérieur d'un agrégat (Mayer et al., 1999) avec des forces de cohésion variables selon le type d'interactions chimiques (Van der Waals, ioniques, hydrophobes).

Zhang et al. (2007) ont suivi l'évolution de la teneur en EPS au cours du passage d'agrégats bactériens de l'état de floccs à celui de granules. Ils montrent que la concentration en EPS extraites par ultrasonication et notamment en protéines augmente de manière importante lors de cette transition alors que celle des polysaccharides varie peu (figure 12). Wang et al. (2006) confirment ces résultats en constatant que lors de la densification des agrégats (cultivés dans de l'effluent synthétique au rapport C/N de 7,7), la quantité d'EPS protéiques extraites par chauffage à 60 °C dans du tampon PBS évolue inversement aux SVI.

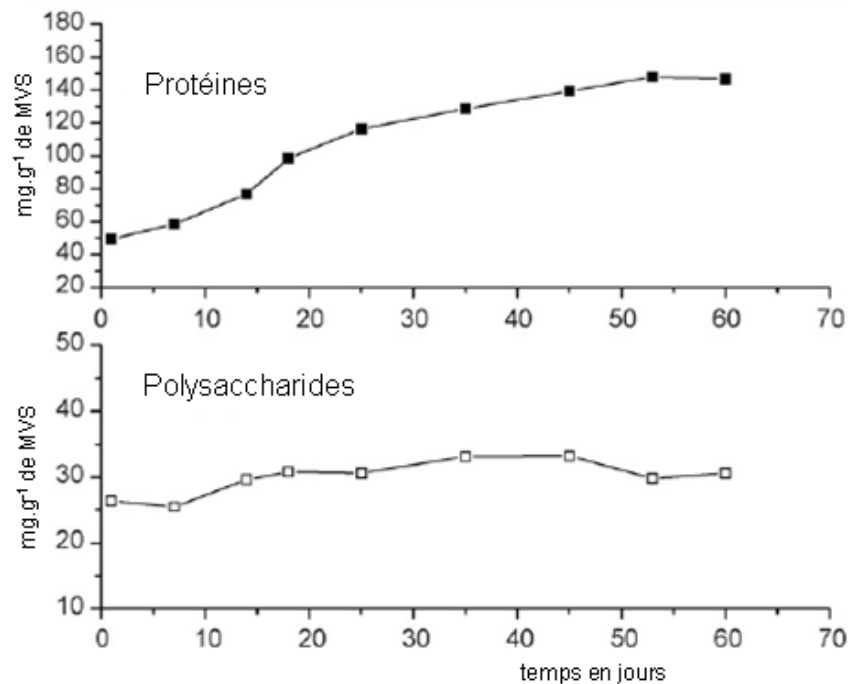


Figure 12 : Evolution de la quantité en protéines et de polysaccharides extraits par ultrasonication pendant la granulation (Zhang et al. 2007).

Selon Tay et al. (2001b) qui extraient les EPS de granules par chauffage à 100 °C, la production de polysaccharides par les microorganismes contribue également à la densification des agrégats et à l'adoption d'une structure granulaire.

En 2009, Avella et al. montrent que dans le cas des biofilms, la production d'EPS peut également être stimulée par la présence de polluants cytotoxiques. En effet, lors de cette étude, les biofilms sont exposés à du cyclophosphamide, une molécule anticancéreuse qui a été retrouvée dans des eaux municipales. Dans ces conditions de culture, les auteurs observent une surproduction de deux polymères, une protéine de 18 kDa et un polysaccharide de 6 kDa. Avella et al., 2009, attribuent cette augmentation à un mécanisme de défense des microorganismes contre le composé chimique dangereux. La production d'EPS apparaît donc là comme un moyen de défense des bactéries. Cela permet de créer autour d'elle une matrice de polymères qui va former une barrière de protection face au milieu extérieur.

Malgré les nombreuses études effectuées, le rôle des EPS dans la densification des agrégats n'est pas clairement établi, et la fonction spécifique des EPS de différentes natures (protéique ou polysaccharidique) reste à déterminer. En effet, selon les études réalisées, les résultats diffèrent fortement. Ces variations peuvent être dues à la difficulté de réaliser des extractions complètes des EPS des granules mais également aux importantes fluctuations observées entre les granules produits dans des conditions différentes ainsi qu'aux interférences des méthodes analytiques de dosage en milieu aussi complexe (Ras et al, 2008a).

II.5. Agrégation et Modèle DLVO

Afin de mieux comprendre l'organisation structurale du granule, certains auteurs ont proposé de décrire les interactions entre les différentes particules de la matrice des agrégats suivant la théorie DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek). Initialement développée sur des colloïdes, la théorie DLVO est un modèle décrivant l'interaction nette entre particules comme un équilibre entre deux facteurs additifs : un terme répulsif issu de répulsions électrostatiques entre charges de même signe et un terme attractif résultant généralement de forces attractives de type Van Der Waals (Hermansson, 1999).

A pH neutre, les particules biologiques, les cellules et de manière globale les agrégats en milieu aqueux sont chargés négativement. Une particule chargée en solution est constituée d'une double couche de contre-ions. Cette double couche ionique en mouvement génère un potentiel électrostatique ou potentiel Zeta qui est à l'origine de la répulsion entre particules de même charge. Jusqu'à un certain seuil, l'augmentation de la concentration en ions peut diminuer l'épaisseur de la double couche et peut ainsi promouvoir l'attraction (Hermansson, 1999). Cependant, comme le montrent Zita et Hermansson (1994), dans le cas de flocculation, lorsque ce seuil est dépassé ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ dans ce cas), la double couche ionique s'épaissit à nouveau, l'énergie de répulsion réaugmente et les liaisons de Van der Waals ne peuvent donc plus s'établir ce qui conduit à une déstructuration de l'agrégat.

Zita et Hermansson montrent également dans ce même article que, aux concentrations ioniques dans lesquelles se développent leurs floccules, les interactions entre les différents composants des agrégats peuvent être expliquées par la théorie DLVO.

En 2007, Pevere et al. obtiennent des résultats similaires à partir de trois différents types de granules soumis à des variations de concentration ionique (Na^+ et Ca^{2+}). Ils constatent en effet l'existence d'une concentration ionique optimale pour leurs granules. En dessous de celle-ci, les cations font décroître les charges négatives portées par les EPS de la matrice des granules entraînant et facilitant l'agrégation. Au dessus de cette concentration, les cations provoquent un accroissement de la charge positive portée par ces mêmes polymères, ce qui va provoquer une augmentation des charges répulsives entre les différents composants de la matrice.

La théorie DLVO peut donc également permettre d'expliquer en partie la stabilité de la structure des agrégats de type granule et la manière dont la force ionique du milieu conditionne les liaisons de Van der Waals entre agrégats. Cependant, la persistance de certains granules, même dans des milieux fortement ioniques, suggère qu'il existe d'autres types d'interactions impliquées dans le processus d'agrégation.

III. Propriétés chimiques des EPS

III.1. Nature chimique et diversité

Les EPS peuvent avoir des origines distinctes. Elles sont en majorité excrétées par les microorganismes, mais, elles peuvent aussi provenir des effluents traités ou du matériel biologique libéré lors de la lyse de microorganismes (Liu et al., 2004b). Par conséquent, les EPS présentes dans la matrice d'un granule sont caractérisées par une grande diversité de propriétés chimiques et l'identification des motifs chimiques clés impliqués dans l'agrégation des EPS reste un enjeu important.

Les analyses effectuées sur la composition de la matrice des granules ont révélé la présence de protéines, de polysaccharides, de lipides, d'acides nucléiques et de substances humiques (Wang et al., 2006).

Les protéines sont composées de longues chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques (chaînes polypeptidiques). Chacun des 20 acides aminés existant possède ses propres propriétés chimiques. Ainsi, ils peuvent être chargés positivement ou négativement, peuvent être polaires ou apolaires, hydrophiles ou hydrophobes. Ces propriétés chimiques dépendent du résidu « R », aussi appelé chaîne latérale, porté par le carbone α de l'acide aminé. Les 20 acides aminés sont répertoriés dans la figure 13 et classés selon ces caractéristiques chimiques.

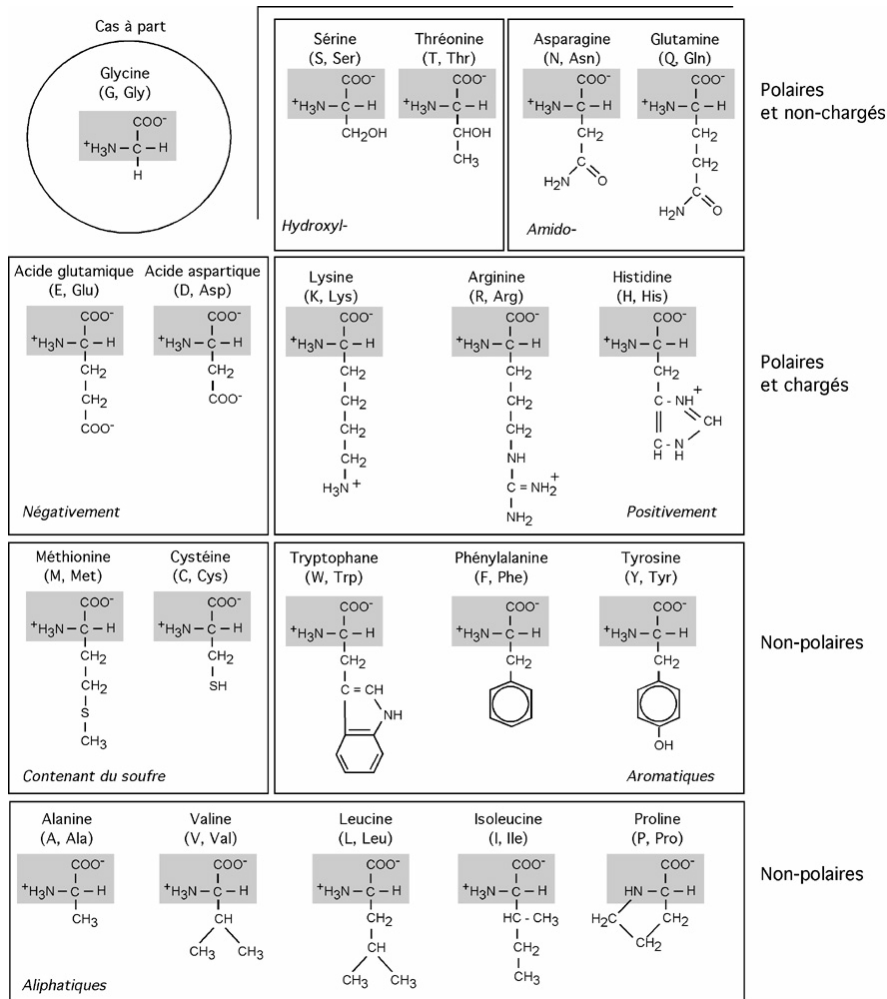


Figure 13 : classement des acides aminés selon les propriétés chimiques de leur chaîne latérale

La succession des acides aminés dans la chaîne polypeptidique est appelée structure primaire. Les chaînes vont prendre des conformations différentes selon la séquence et les propriétés des acides aminés. Tout d'abord, à l'échelle locale, certaines portions de chaîne vont adopter des organisations standards appelées structures secondaires. Ces structures sont le résultat de l'établissement de liaisons hydrogènes entre les acides aminés de la chaîne. Les deux principales structures secondaires retrouvées dans les polypeptides sont les hélices α et les feuillets β (figure 14). L'hélice α est formée par l'enroulement régulier de la chaîne polypeptidique sur elle-même. Les atomes d'azote et d'oxygène du squelette protéique sont reliés entre eux par des liaisons hydrogènes parallèles à l'axe de l'hélice, l'acide aminé n étant ainsi relié à l'acide aminé $n + 4$ (figure 14.A.). La structure de l'hélice α est stabilisée par les acides aminés hydrophobes. Les chaînes latérales des acides aminés sont à l'extérieur de l'hélice et entre en jeu dans les liaisons avec d'autres acides aminés de la protéine.

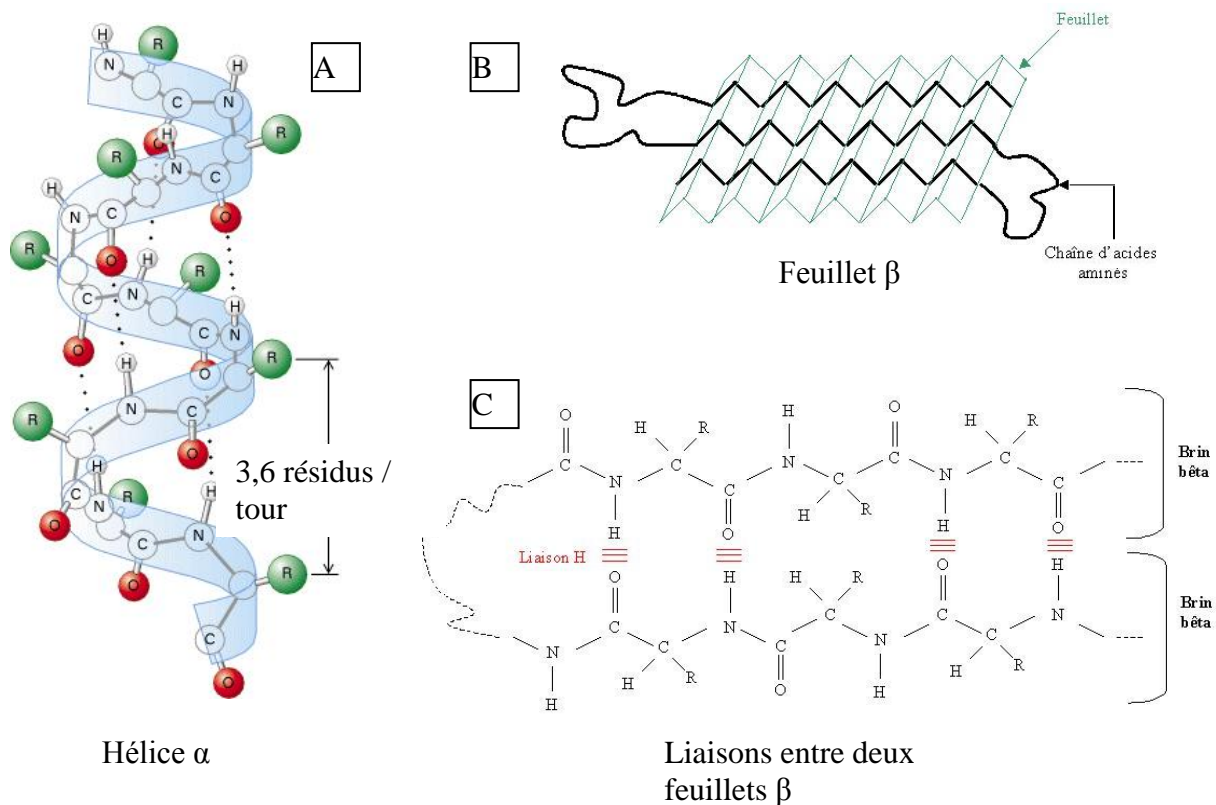
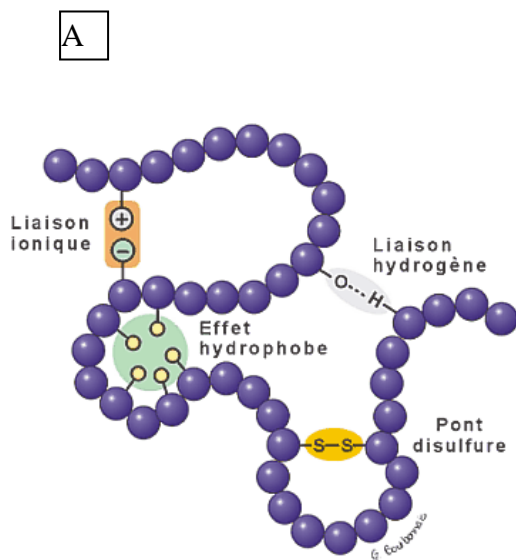


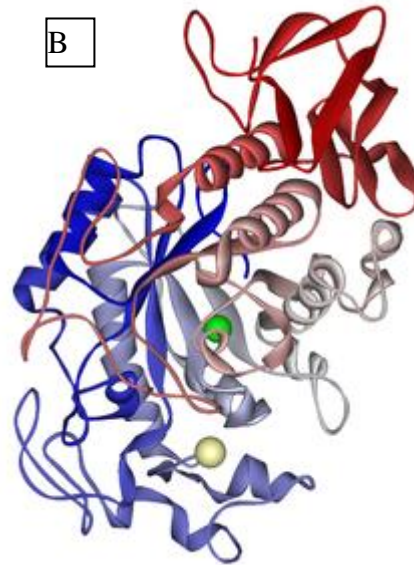
Figure 14 : structure de l'hélice α et du feuillet β impliqués dans la structure secondaire des protéines.

Le feuillet β se matérialise sous forme d'un pli successif avec différentes ondulations de la chaîne polypeptidique (comme un accordéon, figure 14.B.). Un feuillet β donnera lieu à des interactions d'acides aminés d'une même chaîne polypeptidique qui sera repliée sur elle-même (figure 14.C.). Il existe 2 types de dispositions de feuillets β : les feuillets β antiparallèles et les feuillets β parallèles. Les feuillets β antiparallèles sont plus fréquents que la seconde disposition.

Les différentes structures secondaires sont agencées les unes par rapport aux autres pour former la structure tertiaire. Cette structure tertiaire correspond donc au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. La fonction d'une protéine est intimement liée à sa structure tertiaire. Lorsque cette structure est perdue, la protéine perd sa fonction et est dénaturée. La structure tertiaire d'une protéine dépend de sa structure primaire. Elle se forme grâce aux interactions chimiques entre les chaînes latérales des acides aminés et, entre ces chaînes latérales et l'environnement de la protéine (figure 15). Parmi ces interactions, on retrouve principalement des liaisons hydrogènes ainsi que des interactions de van der Waals, des liaisons ioniques, des liaisons hydrophobes et des ponts disulfures. Ainsi, deux protéines ayant une forte similarité de séquence ($> 80\%$ des acides aminés identiques) auront souvent des structures très proches. Cependant, cette structure dépend également de facteurs extérieurs à la protéine comme la composition chimique du milieu, ou l'activité de certaines enzymes. Par conséquent, en fonction de ces paramètres, une même chaîne polypeptidique peut adopter des conformations différentes. En particulier, la séquence d'une protéine comporte une certaine proportion d'acides aminés polaires (hydrophiles) et non polaires (hydrophobes, figure 13). Leurs interactions avec les molécules d'eau conditionneront donc la manière dont la chaîne polypeptidique se repliera. Les acides aminés non polaires auront tendance à éviter l'eau et, inversement, les résidus polaires vont chercher à rester à proximité du solvant aqueux. Ainsi, en milieu polaire, il se formera un cœur hydrophobe au centre de la structure tertiaire, tandis que les groupes hydrophiles resteront plutôt en surface. Et, de la même façon, en milieu hydrophobe, les acides aminés hydrophiles vont se retrouver au cœur de la protéine tandis que les acides aminés hydrophobes vont se retrouver en surface. Des résidus hydrophiles peuvent malgré tout se retrouver à la surface de ces protéines, et donc, en contact avec le milieu hydrophobe. Dans ce cas, il y a de forte chance que ces résidus soient impliqués dans des interactions avec d'autres résidus hydrophiles.



Stabilisation de la structure



α -amylase pancréatique humaine
(sphère blanche : ion calcium,
sphère verte : ion chlore)

Figure 15 : Structure tertiaire des protéines

Enfin, la structure quaternaire des protéines désigne l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques appelées sous unités (identiques ou différentes) par des liaisons non-covalentes (liaisons hydrogènes, liaisons ioniques, interactions hydrophobes et force de Van der Waals, mais rarement des ponts disulfures). L'effet hydrophobe est souvent un facteur prépondérant dans cet assemblage.

Tout comme les protéines, les polysaccharides sont des constituants essentiels du vivant. Ce sont des polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques. Ils sont constitués de chaînes pouvant être très longues et parfois ramifiées et ils sont le plus souvent hydrophiles.

Parmi les différents polysaccharides existant, on peut en citer certains particulièrement présents dans le vivant. Les α -glucanes sont des polysaccharides composés exclusivement de monomères de glucose liés en α (1-4) ou en α (1-6). Ils peuvent être linéaires ou bien ramifiés. Parmi les α -glucanes, on trouve l'amidon, l'amylopectine, le glycogène et le pullulane (liaisons α (1-4) et α (1-6) au niveau des ramifications), ainsi que l'amylose (linéaire, liaisons α (1-4), figure 16) et le dextrane, (liaisons α (1-6) et α (1-3) au niveau des ramifications figure 17).

Les β -glucanes sont des polysaccharides composés de monomères de glucose liés en β (1-3), en β (1-4) ou en β (1-6). Ils sont retrouvés dans les parois cellulaires de certains eucaryotes tels que les champignons les levures ou encore les algues. Ils peuvent être linéaires ou bien ramifiés. Parmi les β -glucanes, on trouve la cellulose, (liaisons β (1-4) et β (1-3), (figure 18), la curdlan produit par *Alcaligenes sp.*, et le zyosan que l'on trouve dans les parois des levures (linéaire, liaisons β (1-3)), la laminarine, qui constitue le sucre de réserve des algues brunes, le pleurane isolé à partir du champignon *Pleurotus ostreatus* et le lentinane à partir du champignon *Lentinula edodes*, (liaisons β (1-3) et β (1-6)).

Les pectines sont des hétéropolysaccharides complexes ramifiés contenant principalement un squelette d'acide polygalacturonique liés en α (1-4) qui peuvent être aléatoirement acétylés et méthylés. Trois pectines différentes ont été isolées à partir des parois cellulaires végétales.

- Les homogalacturonanes composés d'un simple squelette d'acide polygalacturonique branchés en α -(1-4).
- Les homogalacturonanes substitués dont le squelette diffère de celui des homogalacturonanes par des ramifications de β -D-xylose branchés en C3, ou de β -D-Apiosyl-(1,3')- β -D-apiose.
- Les rhamnogalacturonanes I et II composés d'une alternance de résidus galacturonosyl en α (1-4) et de rhamnosyl en α (1-2), avec des ramifications complexes composées de jusqu'à 11 types différents monosaccharides.

Les molécules d'alginate (figure 19) sont composées de régions homopolymériques de blocs d'acides mannuronique en β -D(1-4) (MMMM ...), et d'acide guluronique en α -L (1-4) (GGGG ...), en alternance avec des régions de copolymère d'acide mannuronique en β -D(1-4) et d'acide guluronique en α -L (1-4) (GMGMGM ...). Les acides alginiques bactériens peuvent également être acétylés aux positions 2 ou 3 des acides mannuroniques.

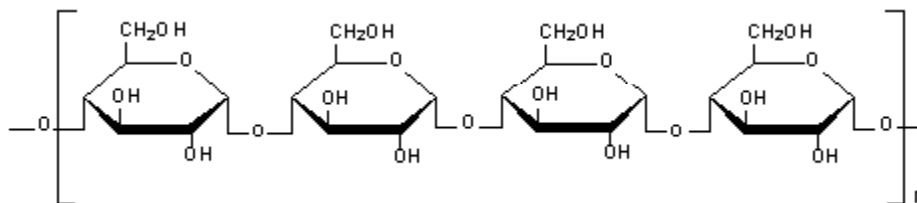


Figure 16 : Formule développée de l'amylose

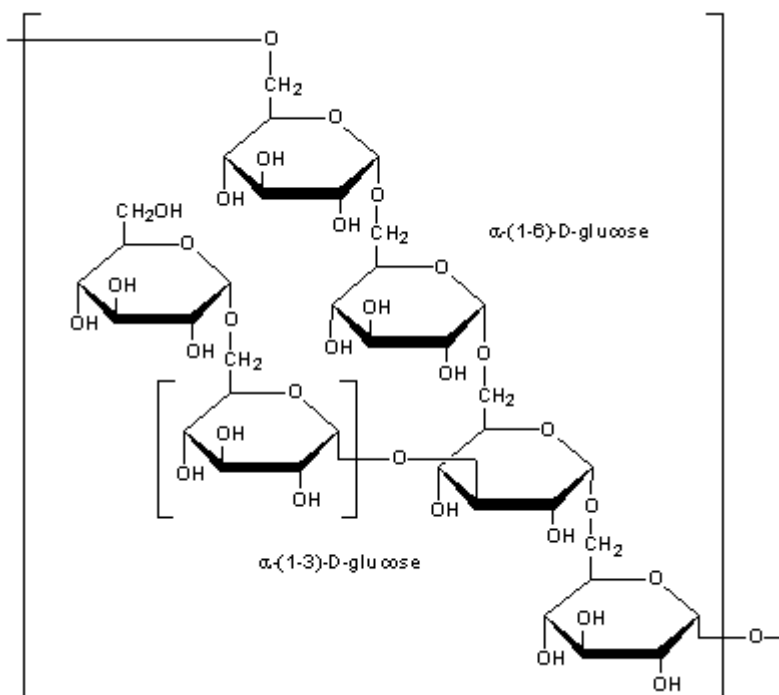


Figure 17 : Formule développée du Dextrane

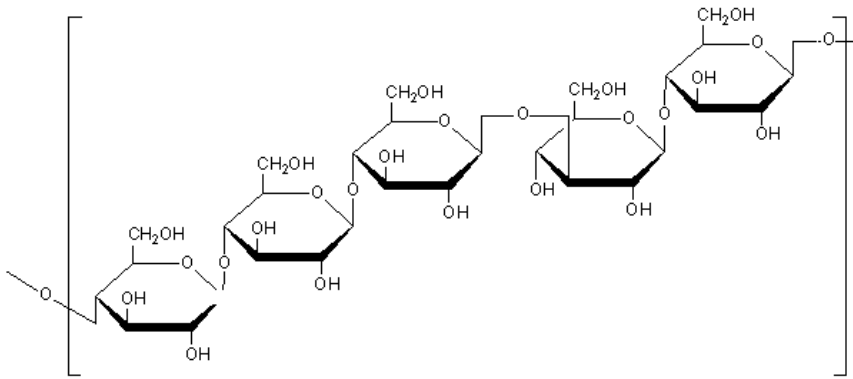


Figure 18 : Formule développée de la Cellulose

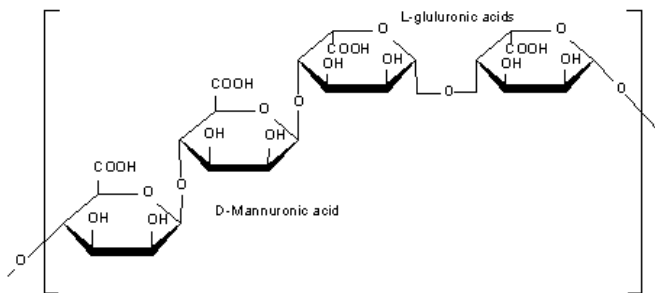


Figure 19 : Formule développée de l'alginate

Les lipides sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles très rarement chargées. Il n'existe pas de définition unique d'un lipide reconnue par l'ensemble de la communauté scientifique. Ceci tient au fait que les lipides forment un ensemble de molécules aux structures et aux fonctions extrêmement variées dans le monde du vivant. De nombreux lipides possèdent de longues chaînes carbonées souvent insaturées appelées acides gras. Ce sont ces acides gras qui confèrent aux lipides leur caractère polymérique.

Enfin, les acides nucléiques (ARN ou ADN), sont des polymères dont l'unité de base est le nucléotide. Ces nucléotides sont liés entre eux par des liaisons phosphodiester. Ce sont les porteurs de l'information génétiques. Ils peuvent être libérés du contenu cellulaire au moment d'une lyse. Ces sont molécules exclusivement linéaires, entièrement hydrophile et chargées négativement.

Au sein du granule, les proportions de chacun de ces polymères vont dépendre des microorganismes présents ainsi que des conditions de culture imposées.

III.2. Description de la structure microscopique de la matrice d'EPS des agrégats bactériens comme un gel de polymères

III.2.1. Définition et étude des gels

Même si la définition d'un gel est relativement controversée, il peut être considéré comme un système semi-solide constitué de polymères formant un réseau tri dimensionnel dans lequel la phase liquide est retenue. Ces matériaux se distinguent en possédant à la fois une composante visqueuse et une composante élastique (Ferry, 1980). Les polymères de cette matrice peuvent être liés par interactions hydrophobes, forces de Van der Waals, liaisons hydrogène ou interactions ioniques. Les molécules constituant les gels peuvent être de différentes natures. On retrouve majoritairement des polysaccharides et des protéines. Ces polymères peuvent être naturels ou artificiels. Comme dans le cas du modèle DLVO, la formation d'un gel dépend de l'équilibre entre forces attractives et répulsives. Trop de forces répulsives provoquent la désagrégation du gel et trop de forces attractives causent généralement une coagulation du matériel (Phillips et al., 1994). Dans certains cas, les entrelacs entre les molécules du réseau suffisent à garantir l'intégrité et les propriétés physiques du gel.

L'étude des gels utilisés notamment en agroalimentaire révèle une grande variabilité dans la texture et l'aspect de ces derniers. Afin de décrire les propriétés d'un gel, plusieurs critères sont utilisés : sa résistance ou son élasticité (équivalents dans le cas des gels), sa viscosité et son opacité. L'élasticité et la viscosité d'un gel, sont déduites de sa réponse à un stress sinusoïdal d'amplitude γ et d'impulsion ω mesurée par un rhéomètre. Cette réponse, également sinusoïdale est décomposée en deux composantes. Une composante τ' en phase avec le stress correspondant à l'élasticité et une composante déphasée de 90° par rapport au stress qui correspond à la viscosité (Ferry, 1980, figure 20).

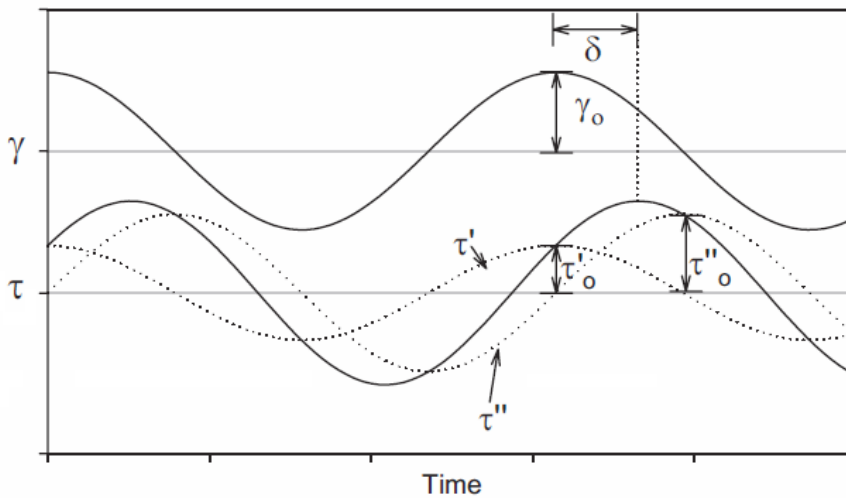


Figure 20 : Décomposition de la réponse τ d'un gel à un stress mécanique sinusoïdal γ en une composante en phase τ' et une composante déphasée de 90° τ'' (Seviour et al., 2009a).

De manière à rendre les mesures effectuées par un rhéomètre indépendantes de la pulsation (ω) choisie par le manipulateur, on définit également souvent le module de stockage G' et le module de perte G'' en rapportant à ω les valeurs de τ' et τ'' :

$$G' = \tau' / \omega \quad \text{et} \quad G'' = \tau'' / \omega$$

Dans le cas d'un gel, l'amplitude de la composante élastique τ'_0 est supérieure à l'amplitude de la composante visqueuse τ''_0 . De la même façon, l'amplitude du module de stockage G'_0 est supérieure à l'amplitude module de perte G''_0 . Lors de mesures expérimentales, on considèrera donc que l'on se trouve en présence d'un gel lorsque cette condition est remplie.

L'opacité d'un gel est souvent un paramètre subjectif car lié à l'appréciation du manipulateur. Cependant, en 1980, Shimada et Matsushita qui étudient différents gels produits à partir de protéines, l'évaluent par la mesure de l'absorbance des gels aux rayonnements ultra violets à 380 nm.

L'obtention d'un gel dépend de nombreux paramètres parmi lesquels on peut signaler la température, le pH, la concentration ionique et la concentration en polymères. La nature des polymères entrant dans la composition du gel est également un facteur déterminant. En effet, c'est de ce paramètre que dépendront les types d'interactions à l'origine de la gélification et donc les propriétés du gel obtenu. Leur influence sur ces structures a été très étudiée et permet de mieux comprendre les liens entre les spécificités des espèces moléculaires mises en présence et les propriétés macroscopiques des structures.

En 1980, Shimada et Matsushita établissent la relation entre la résistance d'un gel de BSA (Albumine de sérum bovin) et sa concentration protéique. Leur étude montre que plus le gel est concentré en protéines, plus il est élastique et résistant (figure 21).

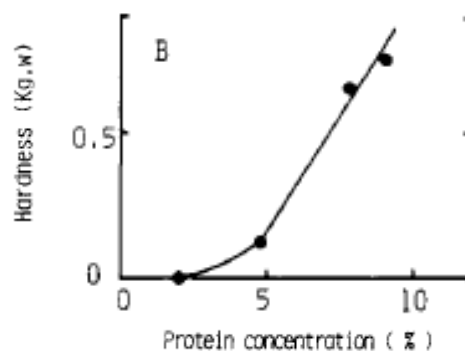


Figure 21: Evolution de la résistance d'un gel de BSA (« hardness ») en fonction de la concentration protéique. La mesure est réalisée à l'aide d'un plongeur pour mesure visqueuse (Shimada et Matsushita, 1980).

Shimada et Matsushita (1980) montrent aussi que le taux d'hydrophobicité des polymères va influencer sur le type de gel obtenu (figure 22). En effet, les protéines contenant plus de 31,5 % d'acides aminés hydrophobes (valine, proline, leucine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane) vont avoir tendance à coaguler et à former des structures compactes, opaques, très résistantes, très peu élastiques et thermo irréversibles. Celles contenant moins de 31,5 % de moles d'acides aminés hydrophobes vont, par contre, former des gels translucides, moins résistants, plus élastiques et thermo réversibles.

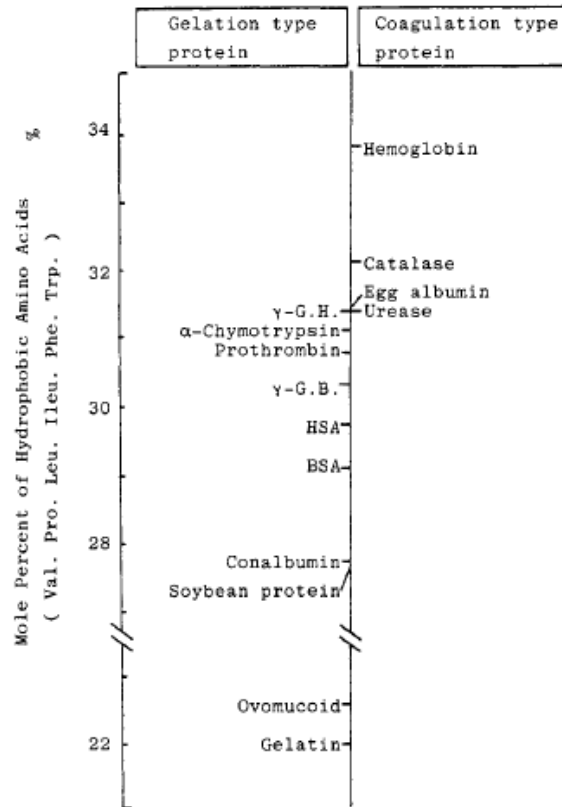


Figure 22 : Relation entre les propriétés de gels protéiques et la proportion d'acides aminés hydrophobes des protéines qui les composent (Shimada et Matsushita, 1980).

La formation des gels étant favorisée par un bon équilibre entre les forces répulsives et attractives, les charges ioniques des molécules composant ces structures vont aussi avoir une influence importante. Dans ce cadre et dans le cas des gels de protéines, l'influence du pH va être importante. Shimada et Matsushita (1980), mesurent l'incidence du pH de solution de diverses protéines à diverses concentrations sur la coagulation visualisée par la variation de la turbidité relative T. Sur la figure 23, on considère que les protéines ont coagulé lorsque T est proche de 1.

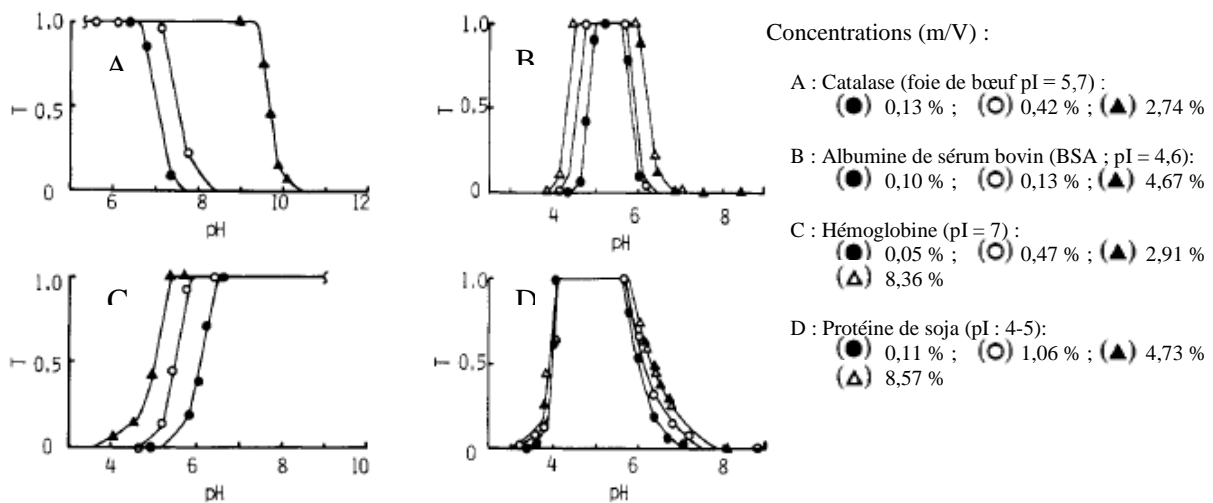


Figure 23 : Evolution de la turbidité relative de solutions de protéines à différentes concentrations en fonction du pH (Shimada et Matsushita, 1980).

On s'aperçoit sur cette figure que le comportement des solutions protéiques face au pH est très variable. Cependant, pour trois des cas étudiés, la gélification est facilitée par un pH proche du point isoélectrique (pI). La BSA fait exception car son pI est de 4,6 alors que la zone de gélification est centrée sur pH 5,5 et s'étale entre 4,5 et 6,5.

La formation d'un gel peut également dépendre de la présence de petites molécules qui vont s'insérer entre deux polymères de même charge. Ainsi, comme le décrivent Sobeck et Higgins en 2002, dans les gels d'alginate, la présence de calcium intervient entre les polymères, selon un modèle de réseau organisé (figure 24).

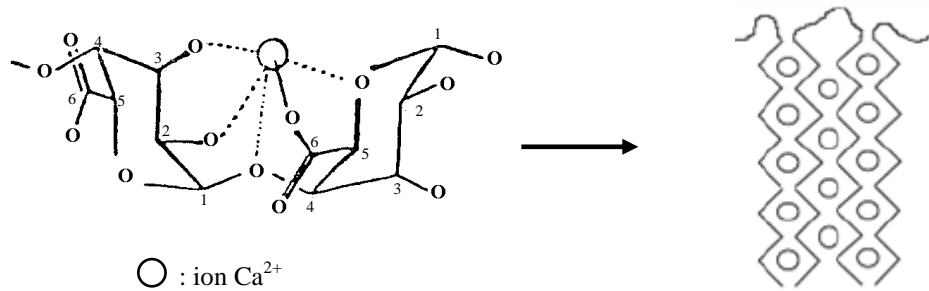


Figure 24 : Formation du gel à base d'alginate en présence de calcium selon Sobeck and Higgins (2002).

Les gels de polysaccharides sont communément obtenus lors du refroidissement progressif des solutions de polymères permettant l'agencement ordonné des molécules (Renard et al., 2006). Toujours selon cette même étude, la plupart des gels produits à partir de polysaccharides sont translucides, la concentration minimale de gélification est 5 à 10 fois inférieure dans le cas des polysaccharides que dans le cas des protéines et ils sont thermoréversibles.

Les conditions d'obtention de gels de polysaccharides dépendent de la nature chimique des polymères. Selon la littérature, de nombreux polysaccharides naturels, produits par des microorganismes présents dans les agrégats bactériens utilisés dans le traitement des eaux usées peuvent être à l'origine de gels. Certaines équipes de recherche sont en effet parvenues à fabriquer des gels à partir d'alginate (Lee and Mooney, 2001), de Xanthanes (Mohammed et al., 2007) de cellulose (Kadokawa et al., 2008) et de gellanes (Nickerson et al., 2003). Ces molécules sont des polysaccharides produits par des microorganismes de biofilms ou de floes (Sutherland et al., 2001).

Les gels produits naturellement sont souvent composés de mélanges de plusieurs polymères qui peuvent être de natures différentes. Dans ce cas, les propriétés du gel découlent de la combinaison des caractéristiques chimiques de chacun des composants dans les conditions imposées. Turgeon et Beaulieu, (2001) étudient l'évolution en fonction de la concentration en ions calcium des caractéristiques rhéologiques de gels composés de mélanges de protéines de lactosérum, et de κ -carraghénane, à différentes proportions (figure 25). Les gels formés de κ -carraghénanes seuls (1 %) sont beaucoup plus fermes, durs et résistants que ceux formés par les protéines de lactosérum. La fermeté et la dureté des gels augmentent fortement lorsque l'on fait varier la concentration en calcium de 0 à 20 mM et s'abaisse si l'on augmente la quantité de calcium au-delà de 50 mM.

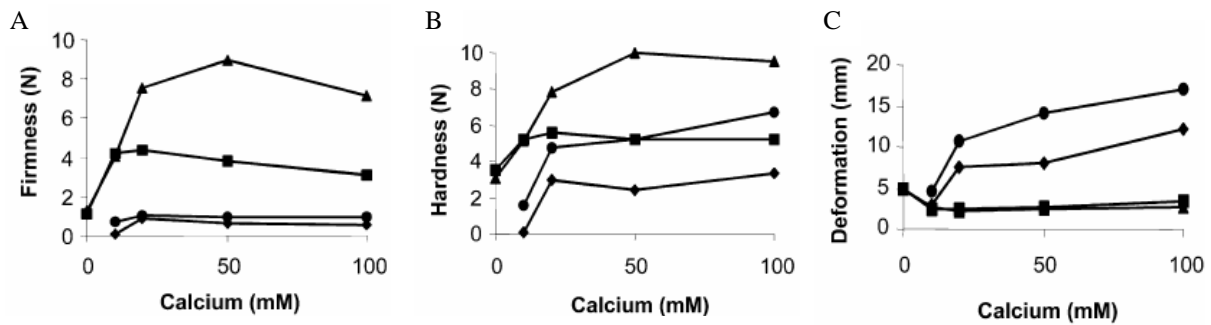


Figure 25 : Effet du calcium sur les gels composés d'un mélange protéine de lactosérum κ -carraghénanes. Les effets de la concentration en calcium sont mesurés par la fermeté (firmness ;A), la dureté (hardness ;B) et la capacité à la déformation (C) de gels composés de protéines de lactosérum seules (9,1 % (m/m)) : ◆, de κ -carraghénanes seules (1 % (m/m)) : ■, d'un mélange protéines de lactosérum (9,1 % (m/m)), κ -carraghénanes (0,1 % (m/m)) : ● et d'un mélange protéines de lactosérum (9,1 % (m/m)), κ -carraghénanes (1 % (m/m)) : ▲ (Turgeon and Beaulieu, 2001).

Dans le cas des mélanges des deux polymères, les auteurs concluent de cette étude que, à faible concentration (0,1 % m/m), les κ -carraghénanes sont capables de s'intégrer au sein du réseau protéique et ne contribuent que faiblement à la structure du gel et à sa résistance aux contraintes. A plus forte concentration (1 % m/m), on observe une synergie entre les deux polymères qui semble accroître la résistance physique du gel au-delà de la somme des résistances des composants gélifiés séparément.

Ils observent également l'effet d'un polysaccharide chargé, la pectine, sur des gels de protéines de lactosérum en fonction du pH. Le point isoélectrique de la pectine utilisée étant très bas, la charge du polysaccharide est toujours négative et augmentera avec le pH. Les protéines de lactosérum quant à elles ont un point isoélectrique de 5,2. Donc, lorsque le pH sera en dessous de cette valeur, elles seront chargées. Pour des pH supérieurs à 5,2, les deux polymères sont donc chargés négativement. Par conséquent, on ne pourra pas observer de gélification en l'absence de cations afin de constituer les doubles couches de contre-ions.

Cette étude permet donc de mettre en évidence que pour des mélanges de plusieurs composés chargés, le pH et la concentration des différents composants sont des paramètres fondamentaux pour le maintien de l'équilibre entre les forces répulsives et attractives et donc pour la constitution de gels. Dans le cas d'association de plusieurs polymères de natures différentes dans la constitution de gels, les propriétés physiques des structures vont différer par rapport à celles de leurs constituants séparés. On s'aperçoit également au travers de ces exemples que l'influence des paramètres environnementaux sur ces gels va également changer.

Les mécanismes physico-chimiques décrits lors de ces expériences réalisées sur des gels peuvent constituer un bon modèle pour décrire les comportements très complexes des mélanges de polymères. Dans le cas des granules, ils peuvent expliquer en partie les interactions possibles entre les différents EPS de la matrice, ainsi que l'influence des paramètres du milieu environnant (température, pH, concentrations ioniques...). De cette manière, cette description pourrait permettre d'établir certains liens entre les échelles microscopiques et macroscopiques. La présence de micro-organismes insérés dans la matrice sous forme de cellules individualisées ou associées en colonies reste toutefois une caractéristique des agrégats bactériens non prise en compte dans les gels étudiés.

III.2.2. Description des granules comme gel composé d'EPS

En 2008, Houari et al. analysent les propriétés rhéologiques de biofilms formés à la surface de nanofiltres utilisés pour le traitement de l'eau. Les caractéristiques rhéologiques des granules sont étudiées à l'aide d'un rhéomètre qui mesure la réaction complexe de la matrice à une contrainte sinusoïdale imposée. La description de la matrice d'EPS comme un gel leur permet de mieux comprendre les origines des propriétés physiques des biofilms qu'ils étudient et ainsi déduire le rôle des différents composants de la matrice d'EPS et des conditions environnementales ayant donné lieu à la formation du biofilm. En l'occurrence, Houari et al. (2008) concluent de leur étude que les propriétés cohésives de leurs biofilms proviennent principalement de leur teneur en polysaccharides. Ils émettent également l'hypothèse que d'un biofilm à l'autre, il est possible d'établir un lien entre les propriétés rhéologiques mesurées et la nature des polysaccharides de la matrice d'EPS. A terme, ces informations pourront être utiles pour lutter contre l'apparition de ces biofilms qui gênent le fonctionnement des nanofiltres.

Seviour et al. (2009a) réalisent une étude similaire sur des granules cultivés en réacteur SBR alimenté par des eaux usées issues d'abattoirs dont le rapport C/N est de 2,4. Le cycle de culture se distingue quant à lui par une période anoxique de 60 min et un temps de décantation de 5 min. Les auteurs démontrent que dans les conditions de culture des granules, l'amplitude du module de stockage G'_0 mesuré à l'aide d'un rhéomètre est supérieur à l'amplitude du module de perte G''_0 (figure 26) et concluent que les granules se comportent comme un gel.

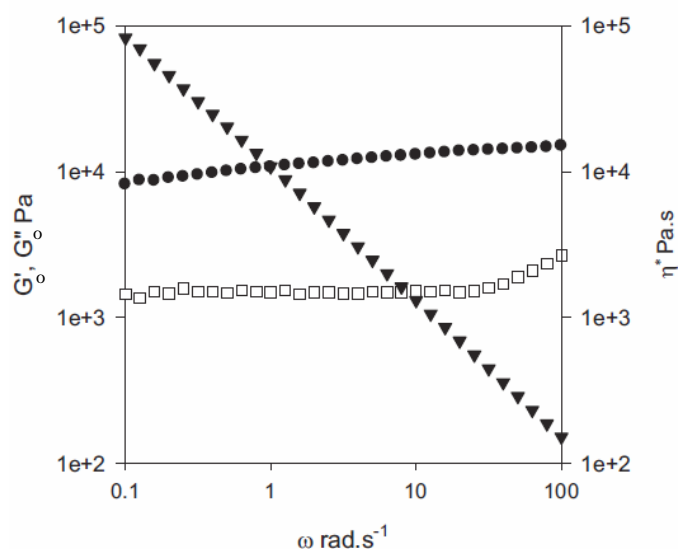


Figure 26 : Mesures des paramètres rhéologiques des granules. Ces mesures sont effectuées à différentes pulsations ω . Les paramètres mesurés sont : les amplitudes des modules de stockage G'_0 (●) et de perte G''_0 (□) ainsi que de la viscosité relative η (▼) des granules entiers. Elles sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre. L'expérience est menée à pH 7 et l'amplitude de la contrainte imposée par l'appareil est de 0,01 (d'après Seviour et al. 2009a).

Dans ce même article, l'évolution du module de stockage G' en fonction de la force ionique, du pH et de la température sont également étudiés. Le but de ces expériences est de déterminer l'impact de ces paramètres sur la résistance du gel.

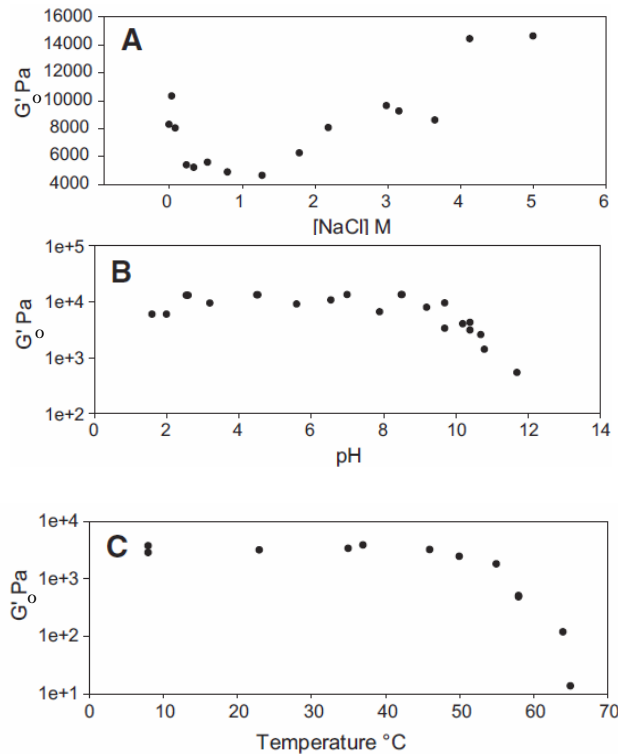


Figure 27 : Evolution de l'amplitude du module de stockage $G'₀$ de granules en fonction de la concentration en NaCl (A), du pH (B) et de la température (C). (d'après Seviour et al. 2009a).

Un effet de type « salting in » et « salting out » est observé lorsqu'on incube les granules dans différentes solutions salines (figure 27.A.). En effet, lorsque la concentration en NaCl des solutions augmente de 0 à 1 M, la charge ionique des protéines contenues dans la matrice augmente ce qui entraîne une accumulation d'eau dans le granule, le rendant plus facilement déformable ce qui se traduit par une diminution du module G' (effet salting in). L'augmentation de la salinité dans le milieu environnant les granules au-delà de 1 M va ensuite exercer une pression osmotique plus importante sur les agrégats dont la teneur en eau va diminuer (effet salting out). Cet « assèchement » va provoquer une rigidification des granules qui va se traduire par une augmentation du module de stockage G' , les granules restant stables jusqu'à concentrations en NaCl de 5 M.

Les effets du pH sur l'élasticité des granules sont également observés. On s'aperçoit sur la figure 27.B. que les agrégats restent stables pour des valeurs de pH inférieures à 10,5 puis que le module de stockage G' s'effondre rapidement lorsque le pH dépasse cette valeur. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse qu'il existerait un groupement chimique chargé positivement qui pourrait être fondamental pour la structure du granule et dont le pI serait proche de 10,5. Toutefois, la forte alcalinité du milieu à ce pH élevé entraîne vraisemblablement des phénomènes de dénaturation des protéines non spécifiques à un groupement ou une région protéique particulière.

L'étude révèle enfin que la matrice gélifiée des granules étudiés est stable jusqu'à 47 °C et « fond » lorsque la température dépasse ce seuil (figure 27.C.)

Par la suite, Seviour et al. (2009b) ont cherché à déterminer quels étaient exactement les EPS (protéines ou polysaccharides) à l'origine de cette structure gélifiée. Pour cela, ils ont eu recours à un protocole de précipitation sélective en milieu acide des polysaccharides extraits des granules et ont mesuré leur capacité à gélifier. Les résultats présentés sur la figure 28 montrent la formation d'un gel résistant pour les pH inférieurs à 9 avec un module G' élevé et largement supérieur au module G'' , puis la perte progressive de la structure pour des pH plus basiques allant jusqu'à la liquéfaction au-delà de pH 12.

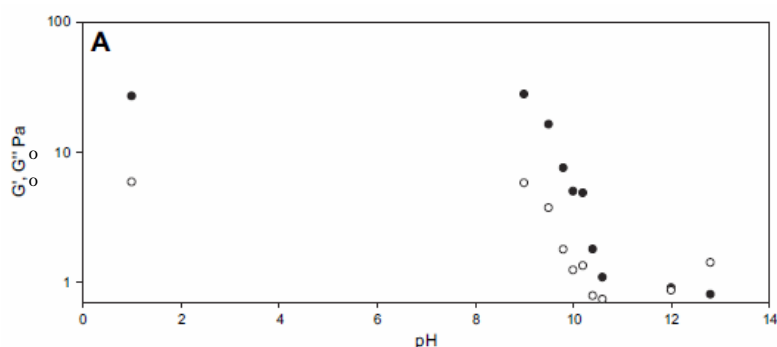


Figure 28 : Evolution des paramètres rhéologiques d'une solution de polysaccharides extraits de la matrice d'EPS de granules en fonction du pH. Les paramètres mesurés sont les amplitudes des modules de stockage G'_0 (●) et de perte G''_0 (○) de la solution. Cette solution de polysaccharides est obtenue par précipitation spécifique en milieu acide des EPS extraites des granules. Lors de cette expérience, la température était fixée à $T = 22$ °C, la pulsation du rhéomètre à $\omega = 10$ s⁻¹ et l'amplitude de la contrainte imposée par l'appareil à 0,1 (d'après Seviour et al. 2009b).

Ces résultats étant très similaires à ceux obtenus avec les granules entiers (figure 27.B), les auteurs suggèrent que les polysaccharides sont à l'origine de la structure gélifiée de leurs agrégats. La poursuite de leurs investigations leur permet également de montrer que la concentration minimale de leur mélange de polysaccharides pour former un gel dans les conditions de culture des granules (pH 8,8, $T = 22$ °C) est de 3,5 g.L⁻¹ soit 0,35 % (m/v).

Afin d'élucider le rôle spécifique des protéines dans la matrice d'EPS des granules, ils mesurent également l'impact de l'ajout de protéines extraites des EPS sur les amplitudes des modules de stockage G'_0 et de perte G''_0 mesurés dans les solutions de polysaccharides extraits de granules (figure 29). Les auteurs en déduisent que les variations de concentration protéique ont peu d'impact sur la structure du gel et que par conséquent, selon eux, les polysaccharides seraient les EPS importantes dans la gélification de la matrice des granules.

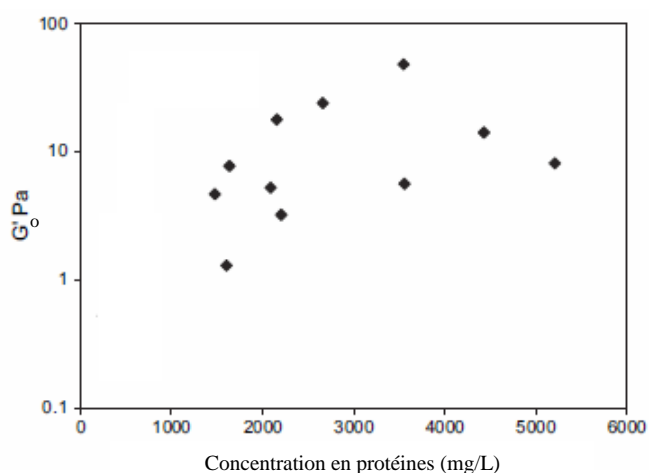


Figure 29 : Evolution de l'amplitude du module de stockage G'_0 d'une solution de polysaccharides extraits de la matrice d'EPS de granules en fonction de la concentration en protéines ajoutées au mélange. Cette solution de polysaccharides est obtenue par précipitation spécifique en milieu acide des EPS extraites des granules. Lors de cette expérience, la température était fixée à $T = 22$ °C, le pH à 8,8, la pulsation du rhéomètre à $\omega = 10$ s⁻¹ et l'amplitude de la contrainte imposée par l'appareil est de 0,1 (d'après Seviour et al. 2009b).

Les travaux de Seviour et al. (2009a et b), suggèrent l'implication des polysaccharides comme agents gélifiants et structurants de la matrice d'EPS. Cependant, d'autres expérimentations seront utiles notamment pour étendre ou non ces affirmations à d'autres agrégats de type granules (et en particulier ceux du LISBP à Toulouse) et pour étudier de quelle manière les protéines interviennent dans cette matrice.

III.3. Influence de l'environnement chimique

Tout d'abord, comme nous l'avons vu précédemment, la composition chimique du milieu de culture des granules va orienter le développement des populations bactériennes et leur métabolisme et ainsi influencer la nature et la concentration des polymères excrétés.

Plus directement, certains paramètres sont à même de modifier complètement le comportement chimique de certains EPS, et comme nous l'avons vu à l'aide du modèle gel, ces modifications au niveau microscopique vont avoir un impact sur les propriétés physiques du granule à l'échelle macroscopique. Ainsi la valeur du pH sera un paramètre prépondérant pour les caractéristiques des granules. En particulier, les charges ioniques des protéines sont directement reliées au pH, et de la protonation de certains groupements portés par les acides aminés, vont dépendre la conformation tridimensionnelle des chaînes polypeptidiques, ainsi que leur capacité à établir des liaisons ioniques.

L'activité de l'eau conditionne également le comportement des EPS. En particulier, une faible activité de l'eau favorisera d'avantage les liaisons hydrophobes. Cette activité de l'eau pourra être modulée par la composition du milieu et en particulier par la présence et la concentration en sels.

Les liaisons ioniques entre les EPS dépendent également beaucoup de la force ionique de l'environnement liquide. En effet, comme l'ont montré Seviour et al. (2009a), des modifications de la concentration en ions peuvent modifier le degré de cohésion de la matrice d'EPS des granules. Cependant, selon les cas, ces variations peuvent augmenter ou diminuer l'intensité des forces reliant les EPS. Tout d'abord, des phénomènes de compétition entre les ions du milieu et les EPS chargés peuvent entraver l'établissement d'interactions ioniques. Mais à l'inverse, comme on l'a vu, c'est la présence d'ions qui peut, en abaissant la répulsion entre macromolécules de même charge, provoquer un effet DLVO. De plus, on a vu également que la présence de cations divalents, et notamment les ions calcium, était nécessaire à la formation de pontage entre certains polymères chargés négativement.

Enfin, la présence de certaines molécules peut aussi influencer les interactions moléculaires. Citons par exemple le cas des détergents qui vont provoquer la déstabilisation des liaisons hydrophobes, ou des chélateurs de cations comme l'EDTA qui peuvent empêcher l'établissement de pontage par les cations divalents.

IV. Méthodes d'étude des EPS

Comme cela est décrit dans le chapitre précédent, en raison de l'hétérogénéité des EPS de la matrice, une grande diversité d'interactions et d'arrangements chimiques peuvent se produire entre les polymères. Dans le cas des floccs, la désagrégation par des moyens mécaniques a permis de montrer la présence d'EPS enchevêtrées dans la matrice qui appartiennent à des groupes chimiques différents tels que protéines et polysaccharides retrouvés en grandes quantités, mais aussi substances humiques, nucléiques, uroniques et lipides en moindres proportions (Jahn et Nielsen. 1998).

L'étude de cette matrice extrêmement complexe nécessite l'emploi de différentes méthodologies afin d'étudier les EPS *in situ* ou *in vitro*, après extraction. Le chapitre suivant présentera quelques unes de ces méthodologies.

IV.1. Extraction des EPS

Dans le cadre d'études structurales des granules aérobies, de nombreuses équipes ont effectué l'extraction des EPS de leurs agrégats. Ainsi, de nombreuses méthodes aux propriétés différentes, employant à la fois des techniques physiques et chimiques, souvent dérivées de celles utilisées pour des extractions similaires sur d'autres types d'agrégats ont été envisagées et testées. Cependant, il est relativement difficile de comparer ces résultats entre eux car la variabilité importante observée est due à de nombreux facteurs parfois indépendants des granules étudiés :

- a- Les unités d'expression des résultats ne sont pas standardisées. Les quantités des différents composants des EPS peuvent être ramenées par masse de matière en suspension (mg.g^{-1} MES, Simon et al., 2009, Wang et al., 2006), par masse de matière organique volatile (mg.g^{-1} MVS, Zhang et al 2007, Adav et Lee, 2008, McSwain et al., 2005), par masse de carbone organique total (mg.g^{-1} COT) ou encore par masse d'EPS totale extraite (mg.mg^{-1} EPS,).
- b- Les extraits obtenus ne sont pas toujours vérifiés en termes de lyse cellulaire et peuvent donc être contaminés par des molécules intracellulaires. Les méthodes d'évaluation de la lyse cellulaire ne sont pas toujours identiques.
- c- Les méthodes d'extraction employées sont différentes d'une étude à l'autre.
- d- L'interférence des techniques d'extraction (en particulier chimiques) envers les méthodes de quantification des EPS n'est pas toujours vérifiée, notamment pour l'EDTA vis-à-vis de la méthode de Lowry.
- e- Les conditions de croissance des agrégats (procédé, alimentation) ne sont pas identiques pour tous.
- f- Les disparités entre les résultats obtenus par les différentes équipes de recherche peuvent en partie être dues au choix du protocole employé pour la quantification des EPS. En effet, ces dosages étant effectués sur des milieux complexes, on remarque de fortes disparités selon la méthode employée. On peut le voir par exemple si on compare les mesures de concentrations protéiques effectuées par Durmaz et Sanin en 2001 par les méthodes de Lowry et de Bradford. C'est également une constatation que font Ras et al. (2008b) après avoir mesuré les variations de signal obtenus lors du dosage de solution protéiques standard par différents protocoles.

Malgré ces disparités, un certain nombre de résultats d'extractions par des méthodes chimiques et physiques ont pu être répertoriés et comparés en exprimant les rendements d'extraction obtenus en mg d'EPS par g de MVS (table 1).

Table 1 : Comparaison des méthodes d'extraction des protéines (PN) et des polysaccharides (PS) de boues granulaires (mg g⁻¹ MVS)

Méthodes	Protocole	PN	PS	Total	PN/PS	Réf
Physiques	Centrifugation 20 000 g	113	118	539	1,0	Simon et al., 2009
	Chauffage 60°C, 3h Centrifugation 10 000 g	21	23	44	0,9	Wang et al., 2006
	Sonication 30 W, Centrifugation 20 000 g	148	30	178	4,9	Zhang et al 2007
	Broyage Chauffage 60°C, 1h	160	50	210	3,2	Li et al., 2006
	Chauffage 80°C, 30 min	238	57	295	4,2	Adav et Lee, 2008
	Chauffage 80°C, 10 min	194	124	669	1,6	Simon et al., 2009
Chimiques	CER (50 g.g ⁻¹ MVS, 1h)	185	188	616	1,0	Simon et al, 2009
	CER (70 g.g ⁻¹ MVS, 4h)	73	11	84	6,7	McSwain et al., 2005
	NaOH 1M	210	26	236	8,1	McSwain et al., 2005
	Formamide NaOH 1M	375	61	436	6,2	Adav et Lee, 2008
Combinées	Sonication Formaldéhyde NaOH 1M	455	85	540	5,4	Adav et Lee, 2008
	Sonication Formamide NaOH 1M	537	109	646	4,9	Adav et Lee, 2008

La méthode utilisée par McSwain et al. (2005) et basée sur l'incubation des granules en présence de Résine Echangeuse de Cations (CER) ne parvient à extraire que 80 mg d'EPS par g de MVS. Cette méthode d'extraction est la plus fréquemment employée dans la littérature pour extraire les EPS provenant d'agrégats bactériens tels que les floccs mais ne semble pas appropriée aux agrégats denses.

Simon et al. (2009), ont quant à eux recours à trois méthodes d'extractions distinctes : le chauffage à 80 °C, l'utilisation de CER, et la centrifugation à 20 000 g. Ces méthodes, appliquées sur des boues granulaires permettent d'extraire plus de 600 mg d'EPS par g de MVS. Cependant, ces expériences ont été menées sur des agrégats granulaires cultivés dans des installations industrielles, en conditions anaérobies, et avec une alimentation en eau résiduaire non synthétique, et donc, à la composition moins contrôlée. Selon les résultats d'extraction publiés (Simon et al., 2009), les EPS extraites sont caractérisées par une très grande richesse en substances humiques (jusqu'à 350 mg par g de MVS) et il est possible que ces composés soient plus faciles à extraire des granules.

En 2008, Adav et Lee. ont étudié un panel de techniques basées sur la combinaison de déstructurations physiques (ultrasons ou chauffage) et de traitements chimiques comprenant des incubations dans le formaldéhyde ou la formamide pendant 1 h, puis en condition de pH élevé (11) pendant 3 h. Ces méthodes, que l'on peut considérer comme poussées, leur ont permis d'extraire des quantités d'EPS allant jusqu'à environ 500 mg par g de MVS et ce sans lyses cellulaires, celles-ci étant détectées par un dosage de l'acide 3-désoxy-D-manno-2-octulosonique (KDO : partie indispensable des lipopolysaccharides, présent chez toutes les bactéries).

Des stratégies ciblant spécifiquement plusieurs types d'interactions entre EPS ont été envisagées afin d'augmenter les quantités d'EPS extraites. Dans l'hypothèse où les méthodes sont sélectives par leur mode d'action, il semble probable, par exemple, que la CER et l'EDTA extraient préférentiellement les EPS liées par des interactions ioniques alors que les ultrasons ou la chaleur pourraient extraire des EPS liées de manière non-spécifique à l'agrégat bactérien.

C'est la stratégie employée par Ras et al. (2008a) en appliquant successivement à des floccs ou à des biofilms, une étape de déstructuration mécanique (basée sur l'utilisation des ultrasons) suivie d'une étape d'extraction des composés hydrophobes (via une incubation en présence d'un agent tensioactif : le tween) et enfin une étape d'extraction de composés ioniques (par incubation dans de l'EDTA qui est un chélateur de cations) (figure 30).

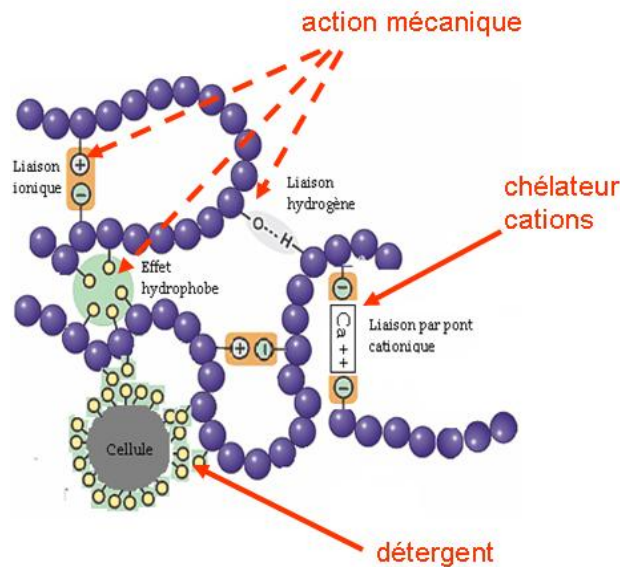


Figure 30 : Actions successives de méthodes d'extraction d'EPS ciblant différentes catégories d'interaction chimiques.

Ce type de stratégie a également l'avantage de permettre un fractionnement des EPS en fonction de leurs caractéristiques chimiques. Ceci peut être utile à la compréhension des mécanismes impliqués dans la cohésion des granules.

Dans la plupart des études, la détection de la lyse cellulaire est évaluée par la mesure de l'activité d'une enzyme intracellulaire, la Glucose-6- Phosphate Déshydrogénase (G6P-DH) (McSwain et al. 2005) qui est une enzyme de la voie des pentoses. Cet indicateur est lui-même un produit de la lyse et peut ainsi s'accumuler dans le granule et être ensuite retrouvé dans la fraction des EPS au cours de leur extraction. La détection de la G6P-DH dans les fractions extraites n'est donc pas obligatoirement signe de lyse cellulaire induite par les méthodes d'extraction. Un contrôle peut être effectué dans l'échantillon avant d'appliquer l'extraction, ce qui permet d'estimer le niveau de lyse initial. Cependant, les résultats de ce contrôle peuvent être également faussés par la barrière diffusionnelle qui peut gêner l'accessibilité du substrat aux G6-PDH présentes au cœur de l'agrégat. De plus, la quantité de G6P-DH contenue dans chaque cellule est très variable et dépend du milieu de culture du micro-organisme et de son état physiologique. Il est même possible qu'elle soit complètement absente de certaines souches. Par conséquent, il est très délicat de faire un lien entre l'intensité d'une activité enzymatique mesurée et un nombre de cellules lysées.

Adav et Lee (2008) ont quantifié le 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO) dans des extraits obtenus par extraction par la chaleur et par différentes combinaisons d'extraction entre le formaldéhyde-NaOH, formamide-NaOH et les ultrasons. Le KDO est un constituant de la membrane bactérienne et sa présence dans les extraits peut signaler la présence de produits intracellulaires. Le KDO peut aussi se retrouver dans l'échantillon à l'état initial avec l'avantage d'être moins sensible à la dénaturation que la G6P-DH.

La présence massive d'acides nucléiques (ADN et ARN) dans les extraits d'EPS peut également témoigner d'un important taux de lyse cellulaire. Cependant le dosage de ces molécules peut difficilement être utilisé pour mesurer le niveau de lyse cellulaire car ces polymères peuvent aussi faire partie intégrante de la matrice d'EPS.

Si on compare l'ensemble des solutions envisagées, on peut distinguer deux types de méthodes d'extraction. Les méthodes douces (comme l'utilisation de résines échangeuses de cations ou le simple chauffage à température modérée) permettent généralement l'extraction d'une assez faible quantité d'EPS, inférieure à 210 mg. g⁻¹ MVS mais garantissent la préservation de l'intégrité des cellules. Les méthodes dures ont recours à des pH très élevés ou à des composés comme le formaldéhyde ou le formamide. Ces méthodes permettent l'obtention de quantités plus élevées d'EPS atteignant plus de 600 mg. g⁻¹ MVS mais risquent de lyser les cellules des granules. Ces dernières déverseraient alors leurs contenus cellulaires qui contamineraient les extraits en introduisant un biais dans l'évaluation de la quantité de protéines et de polysaccharides. De plus, les méthodes utilisées pour évaluer le niveau de lyse cellulaire dans une solution contenant des microorganismes passent souvent par le dosage de molécules intracellulaires complexes qui peuvent être altérées dans ces conditions drastiques d'extraction. En outre, l'emploi d'extractants chimiques génère une contamination des extraits par les produits utilisés ce qui peut entraîner des artefacts lors des caractérisations des molécules extraites. Afin d'optimiser au mieux une stratégie d'extraction, il faudra donc faire un compromis entre l'efficacité de la méthode et la préservation de l'intégrité cellulaire.

IV.2. Analyse des propriétés chimiques des EPS

IV.2.1. Utilisation de méthodes chromatographiques

La chromatographie est une technique physique de séparation d'espèces chimiques. L'échantillon contenant une ou plusieurs espèces est entraîné par une phase mobile le long d'une phase stationnaire contenue dans une colonne. Chaque espèce moléculaire se déplace à une vitesse propre dépendant de ses caractéristiques et de celles des deux phases. Cette technique d'analyse chimique est couplée à un détecteur qui permet de déterminer les durées d'élution de chacune des espèces chimiques analysée ainsi que et de les quantifier. En fonction de la nature des deux phases, on peut donc distinguer plusieurs types de chromatographie. Parmi celles-ci, on peut citer, la chromatographie d'exclusion stérique qui permet de séparer les molécules selon leur volume hydrolique que l'on extrapole à la taille, la chromatographie d'échange d'ions qui sépare les molécules selon leurs charges, et la chromatographie d'interactions hydrophobes qui sépare les molécules en fonctions de leur caractère hydrophobe.

En 2009, Simon et al. ont cherché à évaluer l'intérêt de l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique pour l'analyse des EPS de boues granulaires anaérobies alimentées par des eaux résiduaires naturelles. Cette expérience est réalisée en utilisant deux colonnes de filtration branchées en série : une première colonne séparant les molécules entre 0,1 et 7 kDa et une seconde séparant les molécules entre 10 et 600 kDa. Cette étude a permis de comparer les diversités de tailles des EPS provenant 3 boues granulaires avec celle d'une boue floculante. Ils démontrent ainsi que chaque agrégat bactérien possède une empreinte chromatographique qui lui est spécifique, et que leur contenu en EPS varie avec les conditions de culture imposées. Ils mettent également en évidence un certain nombre de problèmes liés à l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique. En particulier, l'établissement d'interactions ioniques ou hydrophobes (en fonction de la nature de la phase mobile) entre les EPS et la phase stationnaire peut augmenter les temps de rétention dans la colonne et fausser les mesures de tailles des EPS.

En utilisant un tampon Hepes 75 mM additionné de 15 % d'acétonytrile (v/v) lors des analyses par exclusion stérique d'EPS de différentes boues floculantes et granulaires, Villain et al (2010) parviennent à limiter fortement ces effets,

Selon l'étude de Bourven et al. (2011) effectuée sur des EPS de floes de boues activées, des agents utilisés pour l'extraction des EPS peuvent également perturber les analyses. Ainsi, dans cette étude, les auteurs constatent que de l'EDTA résiduaire restant dans les échantillons absorbe les rayonnements ultraviolet à 280 et 210 nm et perturbe les chromatogrammes d'exclusion stérique. Pour remédier à cela, ils ont recours à une autre méthode de détection et quantifient les protéines par leur fluorescence (excitation à 221 nm, et émission à 360nm).

Les méthodes de chromatographie apparaissent comme des outils intéressants pour la caractérisation globale des EPS d'agrégats bactériens car elles permettent d'obtenir des empreintes différentes en fonction de l'origine des EPS. Cependant, il faut être prudent lors de l'interprétation des chromatogrammes. En particulier, dans le cas de la filtration sur gel, la complexité des échantillons et la résolution insuffisante des méthodes peut engendrer des difficultés pour les analyses quantitatives.

IV.2.2. Utilisation de la spectrophotométrie infrarouge

Le recours à la spectrophotométrie infrarouge peut également permettre l'analyse des EPS. Cette technique est basée sur l'absorption de radiations infrarouge par la molécule. Les longueurs d'onde absorbées vont de 2,5 à 25 μm . Les énergies mises en jeu sont principalement des énergies de vibration et de rotation. L'analyse s'effectue par un balayage des longueurs d'onde avec l'obtention d'un spectre infrarouge présentant des bandes d'absorption. Les longueurs d'onde d'absorption des atomes dépendent de leur entourage électronique. Par conséquent, on pourra retrouver sur le spectre, des pics correspondant aux fonctions chimiques présentes dans les molécules. Une table regroupant les longueurs d'onde mesurées des fonctions chimiques permettra alors d'identifier les groupements présents dans les échantillons analysés. La table 2, est celle utilisée dans l'étude de Comte et al. (2006). Toutefois, l'analyse d'un spectre est parfois très difficile car une même liaison peut avoir différents modes de vibration et faire apparaître plusieurs bandes d'absorption.

Table 2 : Plages de longueurs d'ondes d'infra rouges absorbées par les principaux groupements chimiques fonctionnels des EPS selon Comte et al. (2006).

Wave number (cm ⁻¹)	Vibration type	Functional type
3200–3420	Stretching vibration of OH	OH in polymeric compounds
2930–2935	Asymmetric stretching Vibration of CH ₂	
1640–1660	Stretching vibration of C=O and C–N (Amide I)	Proteins (peptidic bond)
1550–1560	Stretching vibration of C–N and deformation vibration of N–H (Amide II)	Proteins (peptidic bond)
1450–1460	Deformation vibration of CH ₂	
1400–1410	Stretching vibration of C=O	Carboxylates
	Deformation vibration of OH	Alcohols and phenols
1235–1245	Deformation vibration of C=O	Carboxylic acids
	Stretching vibration OH	Phenols
1130–1160	Stretching vibration C–O–C	Polysaccharides
1040–1080	Stretching vibration of OH	
<1000	«fingerprint» zone	Phosphate or sulphur functional groups
	Several bands visible	

En 2006, Comte et al. utilisent cette technique pour faire l'inventaire des fonctions chimiques présentes dans des EPS extraites de floes de boues activées. Cela leur permet en particulier de détecter dans leurs extraits la présence de protéines et de polysaccharides.

Cette technique est également utilisée par D'Abzac et al. (2010a et b) pour l'analyse d'EPS de quatre types de boues granulaires anaérobies extraites par neuf protocoles d'extraction distincts. Là encore, les spectres obtenus permettent de connaître le contenu des échantillons d'EPS. Chacune des solutions analysées contient des protéines, des polysaccharides, mais aussi des substances humiques, des acides nucléiques et des lipides. Les spectres obtenus révèlent également la présence de résidus des espèces chimiques utilisées pour les étapes d'extraction (notamment de l'EDTA, du formaldéhyde ou de l'éthanol, selon les méthodes employées).

La spectrophotométrie infrarouge permet donc d'obtenir un certain nombre d'informations sur le contenu des EPS extraites des granules. Cependant, comme dans le cas du recours à des méthodes de chromatographie, la complexité du contenu des échantillons rend les interprétations difficiles. L'observation des spectres ne permet en effet pas de caractériser avec précision les polymères et de distinguer notamment différentes espèces de polysaccharides ou de protéines. En outre, le chevauchement des pics, observé systématiquement dans ces mesures, empêche les quantifications des espèces chimiques détectées.

IV.3. Utilisation d'agents spécifiques

Il est difficile de connaître la contribution respective aux propriétés physiques des granules de chacun des types moléculaires et de chacun des types d'interactions chimiques présents dans les agrégats. Une des voies employée pour cela a été d'observer les effets de la destruction spécifique de ces molécules et de ces liaisons. Ces destructions ont été induites par des incubations des granules avec différentes enzymes catalysant spécifiquement les ruptures des chaînes polymériques des différents types d'EPS, ou avec des agents chimiques capables de déstabiliser les différents types liaisons intermoléculaires.

Dans le cas des floes, la présence d'EPS liées à ces cations divalents est mise en évidence lors de la déstructuration des floes de boues activées par une résine échangeuse de cations. La quantité d'EPS libérées (entre 50 et 220 mg.g⁻¹ MVS) augmente avec la teneur en ions divalents dans l'extrait (Wilén et al., 2003) (figure 31).

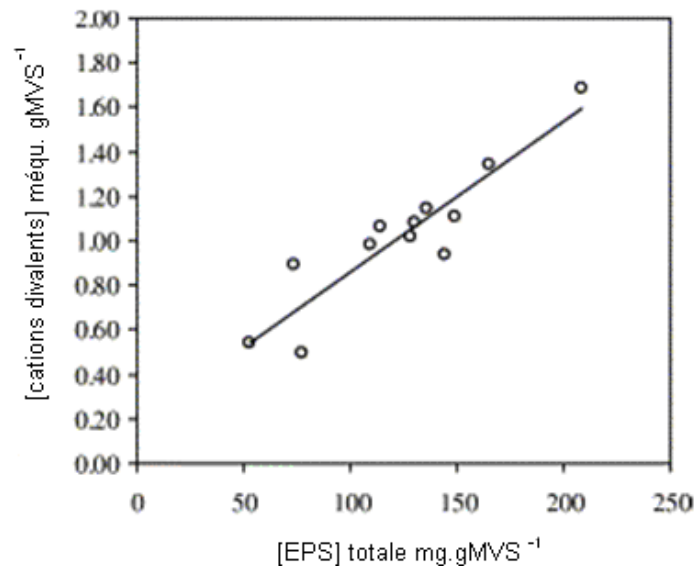


Figure 31 : Relation entre la quantité de cations divalents et la quantité de polymères extraits à partir de boues activées (Wilén et al., 2003).

Dans le cas de granules, les expériences de D'abzac et al. (2010a) laissent également supposer que les cations divalents jouent un rôle important dans la cohésion. En effet, en comparant les résultats d'extraction obtenus à partir de boues granulaires anaérobies utilisées pour le retraitement d'eaux usées dans des installations industrielles, on s'aperçoit que les incubations dans de l'EDTA 2 % pendant 3h sont très efficaces. Selon les résultats obtenus, ce traitement permet d'augmenter les quantités extraites de 155 % par rapport au procédé classique utilisant la CER.

Suite à des digestions par diverses enzymes, Adav et al. (2008a) observent les altérations de structure de granules alimentés par un effluent synthétique présentant un rapport C/N de 1,4. Les dosages des EPS extraites avant et après traitements confirment que la matrice d'EPS des granules contient de protéines accessibles aux protéases puisque un traitement de 1 h à 37 °C par de la protéinase K permet de diminuer de 96% le contenu en protéines extractibles. De même une diminution de 55 % et 60 % du contenu en polysaccharides extractibles est observé après traitement de 1 h à 37 °C par une α -amylase et une β -amylase respectivement. Enfin, il est possible de digérer 86 % du contenu en lipides des granules par un traitement de 1 h à 37 °C par une lipase.

V. Rôle des EPS dans la cohésion des granules

V.1. Influence de la nature chimique des EPS

Un certain nombre d'études ont été réalisées dans le but de préciser le rôle respectif des divers types d'EPS et des fonctions chimiques portées par ces molécules. En 2005, McSwain et al., quantifient les différents types d'EPS extraites de granules alimentés par du milieu synthétique par agitation en présence de résine échangeuse de cations (CER) avec ou sans homogénéisation. Ils constatent une large prédominance des protéines en terme de quantité puisque, selon les modes d'extraction employés, celles-ci sont représentées 6 à 8 fois plus que les polysaccharides (table 1). En 2008, Adav et Lee parviennent à la même conclusion à partir de granules alimentés par de l'eau usée synthétique présentant un rapport C/N de 1,4 et en utilisant un panel d'agents chimiques incluant le formaldéhyde, le formamide et la soude concentrée à pH 11. Selon la méthode d'extraction employée, le rapport entre les quantités de protéines et de polysaccharides varie entre 5 et 6 (table 1). De leur côté, Zhang et al. (2007) ainsi que Wang et al. (2006) remarquent que le passage de leurs agrégats bactériens (alimentés par de l'effluent synthétique de rapports C/N respectifs de 7,2 et 7,7) de l'état de floc à celui de granule s'accompagne d'une augmentation sensible de la quantité d'EPS protéiques, extraites respectivement par ultrasonication et chauffage à 60 °C, mais pas de polysaccharides.

Ces quatre études semblent donc accorder une grande importance à la présence de protéines dans les caractéristiques des granules. Cependant, Ahimou et al. (2007) ont montré que l'énergie de cohésion, déterminée par Microscopie à Force Atomique (AFM), de biofilms augmente avec la teneur en polysaccharides (coefficient de corrélation $R = 0,90$) et diminue avec le ratio PN/PS (corrélation $R=0,92$), alors que les protéines n'affectent pas cette cohésion ($R=0,59$). La diminution du ratio PN/PS avec l'augmentation de la cohésion suggère que la dominance des polysaccharides par rapport aux protéines serait favorable à la stabilité des biofilms.

Allison et al., (1998) montrent quant à eux, toujours dans le cas des biofilms, que la formation des agrégats est liée à la production d'EPS polysaccharidiques et émettent l'hypothèse que le détachement de cellules, lors de période de famine, est provoqué par la dégradation enzymatique de ces mêmes polysaccharides.

En 2008, Adav et al. effectuent des digestions enzymatiques des EPS de granules alimentés par de l'eau usée synthétique présentant un rapport C/N de 1,4. L'objectif est d'éliminer sélectivement les différents types de polymères de leurs agrégats observés au microscope. Pour cela, ils effectuent des incubations de leurs agrégats dans des protéases ainsi que dans des α et β -amylases (hydrolysant toutes les deux les liaisons α (1-4) des α -glucanes). Puis, ils effectuent des marquages des EPS des granules digérés. Ils utilisent pour cela différents marqueurs. L'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) se lie de façon covalente aux amines primaires et permet le marquage des protéines via les résidus lysines ou les acides aminés N-terminaux. La concanavaleine A marque les polysaccharides. En effet, ce peptide de la famille des lectines se lie spécifiquement aux résidus glucose et mannose. Le blanc de calcofluor, forme des ponts hydrogènes avec les liaisons β 1-4 et β 1-3 des glucanes. Il constitue donc un marqueur spécifique des β -glucanes. Le Nile rouge fluoresce en présence de lipides (Greenspan and Fowler, 2010). Le SYTO 63 marque l'ADN à intracellulaire permettant la localisation des microorganismes.

Lors de cette étude, l'élimination des protéines et des α -polysaccharides des agrégats par les protéases et les α -amylases ne provoque pas de perte significative de structure. En revanche, l'action des β -amylases résulte en la désintégration pure et simple des granules (figure 32).

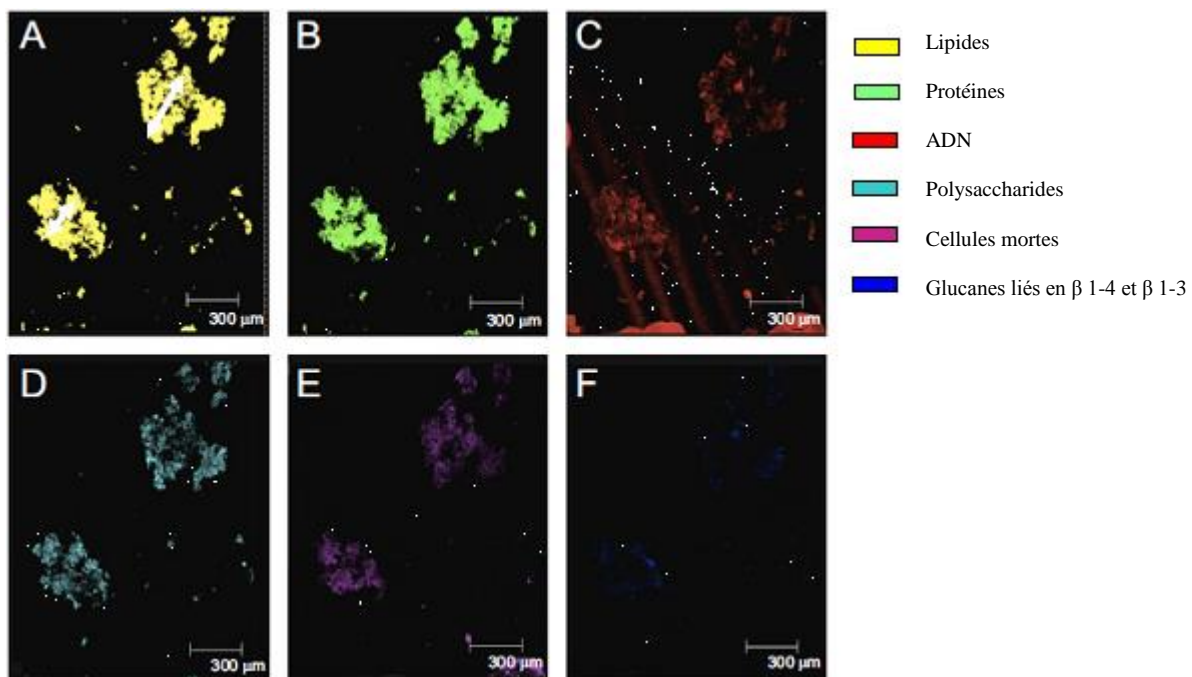


Figure 32 : Image d'un granule marqué et observé au microscope confocal à balayage laser (CLSM) après hydrolyse enzymatique par une β -amylase (marquage des α -polysaccharides (A) jaune : lipide (rouge de nil) ; (B) vert : protéine (FITC) ; (C) rouge : acides nucléiques (SYTO 63) ; (D) bleu clair : α -polysaccharides (concanavaleine A) ; (E) rose : cellules mortes (SYTO bleu) ; (F) bleu foncé : β -polysaccharides (blanc de calcofluor). (Adav et al., 2008).

L'article conclue alors que c'est la digestion des β -polysaccharides qui entraine cette destruction. Cependant, il y a confusion puisque les β -amylases ne digèrent pas les β -polysaccharides mais les α -polysaccharides, et plus précisément les liaisons glucose – glucose en α (1-4). Par conséquent, au cours de ces expériences, les α (1-4) glucanes ont été les seuls polysaccharides ciblés par les enzymes utilisées. En effet, les α et les β -amylases clivent les mêmes liaisons osidiques (les liaisons α (1-4) glucanes). Les α -amylases clivent au cœur de la chaine de glucoses (action endogène) alors que les β -amylases éliminent les résidus glucoses deux par deux depuis l'extrémité non réductrice de la chaine (figure 33).

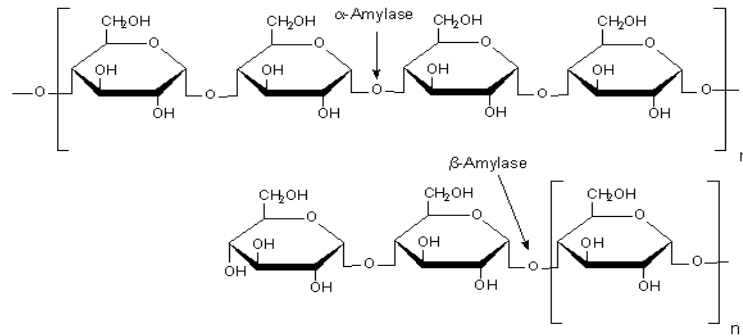


Figure 33 : Spécificité de l' α -amylase et de la β -amylase.

Compte tenu de leur spécificité commune pour les α (1-4) glucanes, il est difficile d'interpréter l'effet drastique de la β -amylase observé au microscope confocal alors qu'aucune altération n'a été observée après digestion par l' α -amylase. Ces différences peuvent être dues à des problèmes de concentration ou de niveau d'activité des enzymes, ou encore à des problèmes de diffusion dans les agrégats. Cependant, étant donné le niveau important de la déstructuration observée, on peut tout de même supposer que les α (1-4) glucanes ont un rôle important dans la cohésion des granules.

Seviour et al. (2009b) ont cherché à évaluer la capacité des polysaccharides extraits de leur granules à s'associer et à former une structure gélifiée *in vitro*. Les agrégats qu'ils utilisent pour cela sont alimentés en eau usée d'abattoir dont le rapport C/N est 2,4 qui sont décrites comme des conditions favorables à l'implantation des bactéries autotrophes et à la sécrétion d'EPS protéiques. Les EPS sont ensuite extraites par ajout de soude 0,1 M et l'évolution de leurs propriétés rhéologiques (viscosité et élasticité) en fonction du pH sont mesurées. Ces mesures sont également réalisées spécifiquement sur les polysaccharides après que ceux-ci aient été enrichis par précipitation spécifique en milieu acide. Selon les auteurs, il apparaît à la suite de ces expériences que les polysaccharides des EPS des granules ont le potentiel nécessaire pour être à l'origine des propriétés physiques de leurs agrégats et ce sans le concours des protéines.

Ces études pointent donc plus particulièrement le rôle des polysaccharides dans la cohésion des agrégats de type granule. Il est d'ailleurs plausible que les rôles respectifs des polysaccharides et des protéines varient d'un granule à un autre en fonction de leur condition de culture et en particulier du rapport C/N de leur alimentation qui diffère fortement d'une équipe de recherche à une autre. En effet, selon Durmaz et Sanin (2001), les variations de ce rapport dans l'alimentation de floes de boues activées vont influencer sur la proportion de protéines et de polysaccharides des EPS. D'après cet article, avec une forte concentration en azote, on obtiendra une forte production protéique et avec une forte concentration en carbone, une élévation de la production de polysaccharides (figure 34).

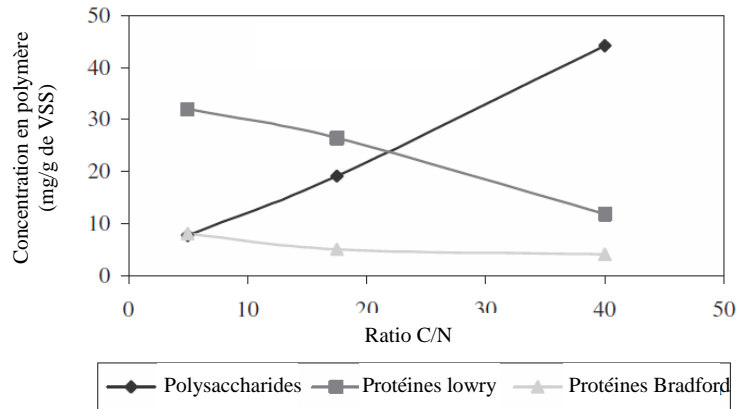


Figure 34 : Evolution des quantités de polysaccharides et de protéines extraits de floes de boues activées en fonction du rapport C/N de l'alimentation. L'extraction est effectuée par une méthode utilisant de la résine échangeuse de cation (Durmaz et Sanin, 2001).

Au final, en faisant une synthèse des éléments apportés par ces différents articles, on peut penser que d'une manière globale, les protéines et les polysaccharides des granules jouent tous les deux un rôle dans la cohésion de la matrice d'EPS. C'est la conclusion à laquelle arrivent Seviour et al. (2009a) en mesurant la perte d'élasticité dans le temps de granules aérobies soumis à l'action de différentes enzymes : une protéase de *Streptomyces griseus*, une α -amylases de *Bacillus licheniformis*, une β -amylases d'orge une lipase de *Candida rugosa* et, une RNase et une DNase de pancréas bovin. Selon cet article, l'élasticité des granules diminue de manière équivalente lorsque les protéines sont digérées par une protéase et les α -polysaccharides par une α -amylase (figure 35). Dans le cas des α -polysaccharides, on note le problème inverse de l'étude de Adav et al. (2008), car on observe un effet de la digestion des α (1-4) glucanes par l' α -amylase, mais pas par la β -amylase. Malgré cela, on peut la aussi supposer un rôle important des α -polysaccharides, et par conséquent, on peut en déduire que dans le cas de ces granules, l'action combinée des protéines et des α (1-4) glucanes est nécessaire au maintien des propriétés physiques de l'agrégat.

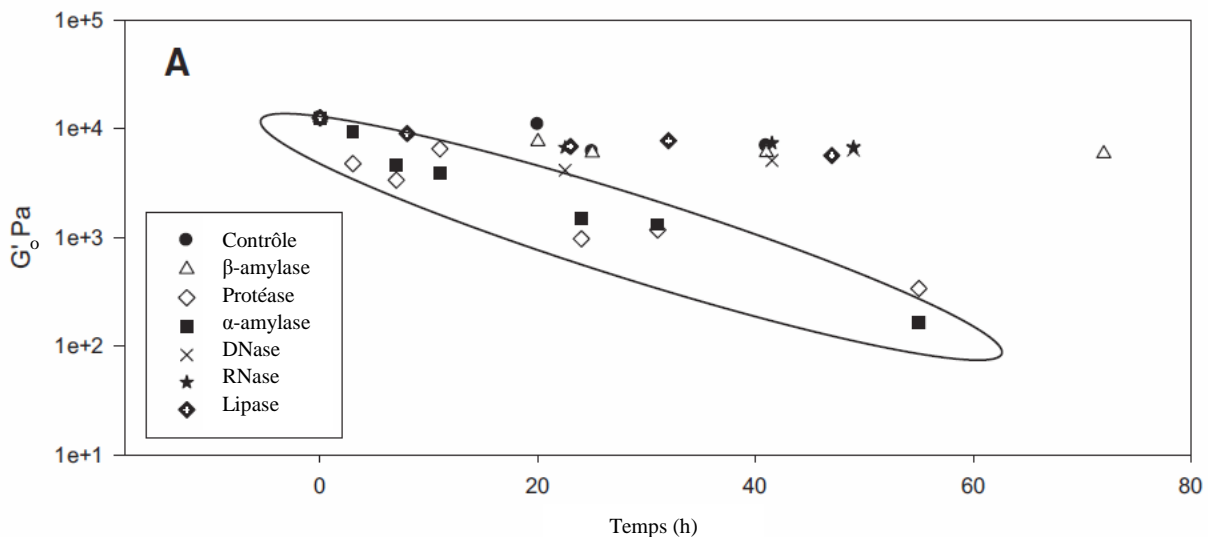


Figure 35 : Evolution au cours du temps de l'amplitude du module d'élasticité G'_0 (mesuré à l'aide d'un rhéomètre) d'un granule soumis à l'action des différentes enzymes (d'après Seviour et al., 2009a)

V.2. Rôle des interactions chimiques

Toute particule colloïdale ou molécule en solution présente des caractéristiques chimiques particulières qui lui permettent d'établir des liaisons faibles. Les liaisons hydrogènes, ioniques, hydrophobes et de Van der Waals, sont les principales interactions entre les composants d'un agrégat (Mayer et al., 1999). La force d'interaction de ces liaisons est relativement faible par comparaison à celle des liaisons covalentes (Figure 36).

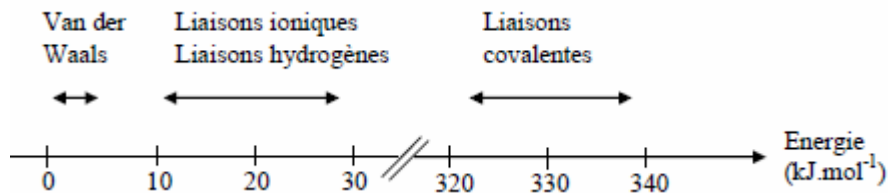


Figure 36 : Echelle de la force des liaisons.

Cependant, la multitude de ces liaisons peut occasionner des interactions fortes permettant de stabiliser la structure de l'agrégat. Cette partie a pour objectif de décrire l'établissement des interactions au sein d'un agrégat bactérien, ainsi que l'implication des EPS dans la matrice structurante de l'agrégat.

V.2.1. Liaisons ioniques

L'agrégation particulaire ou cellulaire n'est pas un phénomène spontané en raison des charges naturellement négatives des biomolécules qui induisent la répulsion électrostatique. Cependant, ce phénomène de bio-agrégation, qui se produit dans des cultures pures ainsi que dans l'environnement, est souvent associé à la présence de flocculant (ions métalliques ou polymères produits par les bactéries). Dans le cas des floccs, Sobeck and Higgins (2002) ont examiné l'influence des cations sur les boues activées et ont montré que l'ajout de Mg²⁺ et Ca²⁺ jusqu'à des concentrations de 15 méq.L⁻¹ (7,5 mM) augmente l'épaississement par bio-floculation des boues activées d'un facteur cinq alors que la présence de Na⁺, dans les mêmes proportions, entraîne une défloculation des boues.

La spécificité des cations divalents dans le phénomène de floculation a aussi été confirmée par Urbain et al. (1993), avec l'ajout de cations monovalents tels que Na⁺ ou K⁺ qui ont conduit à une détérioration des propriétés du floc. Le pontage par cations divalents est donc mis en avant comme un mécanisme important dans les processus de floculation (figure 37).

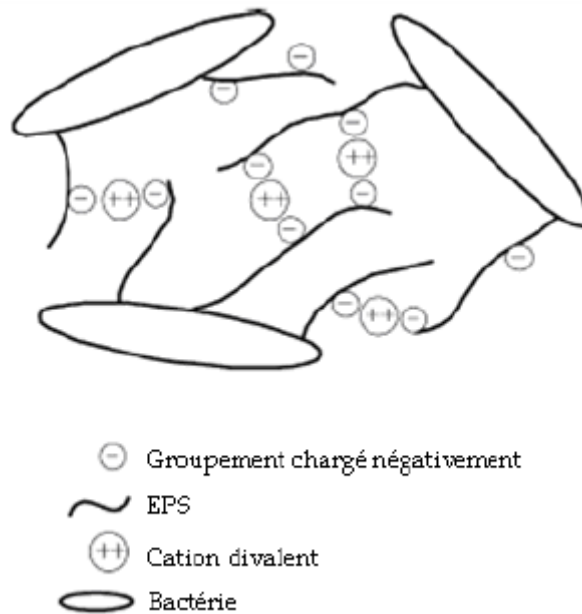


Figure 37 : Représentation schématique du pontage cationique à l'intérieur d'un agrégat bactérien (échelle non respectée), selon Sobeck and Higgins (2002).

En 2006, Sheng et al. mesurent les variations de sensibilité à l'érosion de flocs en fonction de paramètres environnementaux. Pour cela, ils font subir à leurs agrégats différemment traités une agitation de $800 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$ d'intensité et mesurent la proportion k_{ss} de matière solide qui est détachée lors de l'opération. Cette proportion est un indicateur de la sensibilité à l'érosion des flocs. Une variation d'énergie d'adhésion ($\Delta(\Delta G_{\text{adhésion}}/RT)$) est ensuite mathématiquement déduite à partir du logarithme de cette sensibilité à l'érosion (Mikkelsen et Nielsen, 2001). Une forte variation d'énergie d'adhésion correspond alors à une forte sensibilité à l'érosion et donc à une faible force de cohésion. Lors de cette étude l'EDTA apparaît comme un agent très déstabilisateur puisqu'il provoque une importante augmentation de la sensibilité des flocs à l'érosion, indépendamment des conditions de croissance des boues (Figure 38). L'EDTA est un agent chélatant qui complexe les ions divalents liés par pontages ioniques. Ces résultats montrent que les interactions ioniques, et en particulier les cations divalents, jouent un rôle déterminant dans la stabilité du floc.

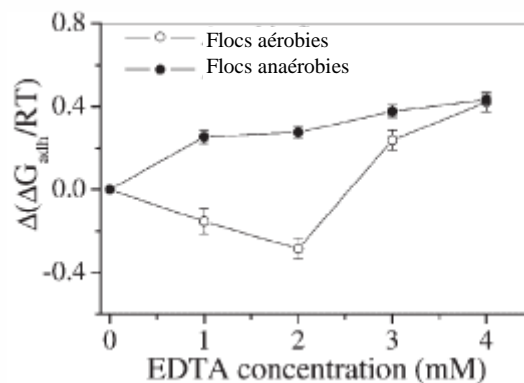


Figure 38 : Influence de la déstructuration des liaisons ioniques par ajout d'EDTA sur la variation d'énergie d'érosion des flocs de boues activées (Sheng et al., 2006).

La relation entre la sensibilité à l'érosion et la concentration en EDTA suggère que les EPS associées aux cations divalents sont chargées négativement. Effectivement, à pH 7, les groupements carboxyles des acides aminés (en particulier, ceux des acides aspartique pKa = 3,9 et glutamique pKa = 4,3) sont majoritairement déprotonés, ce qui conduit à une charge globalement négative de certaines protéines. De plus, la composition des sucres, tels que les acides uroniques, peut également exposer des groupements carboxyles chargés négativement (acide glucuronique : pKa = 3,18, acide guluronique : pKa = 3,65, acide mannuronique : pKa = 3,38). Les propriétés ioniques des EPS peuvent ainsi participer à la bio-floculation par pontage cationique.

Le caractère ionique des protéines et des polysaccharides étant lié au pH du milieu, Seviour et al. (2009b) étudient, à l'aide d'un rhéomètre, l'évolution, en fonction du pH, de paramètres rhéologiques de solutions d'EPS extraites de leurs granules cultivés en eaux usées d'abattoir dont le rapport C/N est 2,4. Les paramètres mesurés découlent de la réponse des solutions testées à un stress mécanique généré par la rotation d'une plaque horizontale sur la quelle repose l'échantillon. Ce stress, assimilable à une contrainte de cisaillement est transmis à la plaque supérieure ce qui permet l'obtention d'un signal décomposé en deux modules, le module de stockage G' et le module de perte G'' , dont les évolutions en fonction du pH sont représentées sur la figure 39. Comme indiqué, on considère que les polymères d'une solution forment un gel lorsque le module de stockage G' dépasse le module de perte G'' .

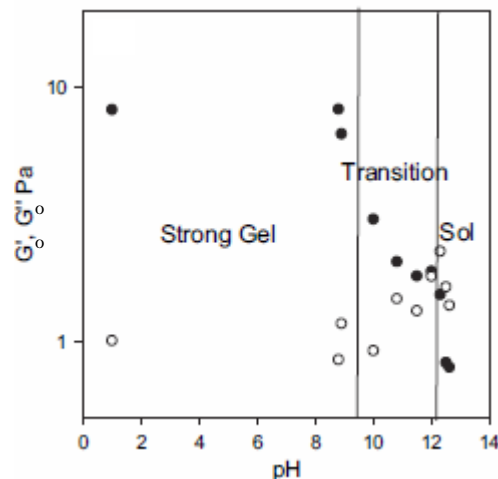


Figure 39 : Evolution des paramètres rhéologiques d'une solution d'EPS extraites de granules en fonction du pH. Les paramètres mesurés sont les amplitudes des modules de stockage G'_0 (●) et de perte G''_0 (○) de la solution (d'après Seviour et al., 2009b).

Cette expérience leur permet alors de conclure que l'aptitude des EPS des granules à s'associer dans une structure de type gel dépend étroitement du pH puisque les gels n'apparaissent qu'à certains pH (pH < 9,5). Tout comme dans le cas des floes, cela met en évidence le rôle important des interactions ioniques dans le maintien de la cohésion au sein de l'agrégat. Ce comportement peut être dû à la présence dans ces EPS de groupements fonctionnels chargés positivement à ces pH et dotés par conséquent d'un pKa proche de 10,5.

V.2.2. Liaisons polaires et apolaires

Zhang et al. (2007) démontrent le lien entre l'hydrophobicité cellulaire et la formation des granules. Celle-ci augmente significativement lors du passage de boue floculante à granulaire. Wang et al (2005) observent la répartition de l'hydrophobicité, mesurée par adhérence à l'hexadécane de particules détachées du cœur et de la surface des agrégats. Ils constatent que l'hydrophobicité est beaucoup plus élevée dans les parties centrales du granule que dans les parties externes.

L'influence des interactions hydrophobes avait également été étudiée dans le cas d'autres types d'agrégats bactériens. En effet, en 2008, Gao et al. ont montré que l'hydrophobicité relative des biofilms mesurée par adhérence à l'octane, est diminuée de 30 à 15 % après quatre lavages dans un tampon neutre qui ne laisse autour des cellules qu'entre 1 et 5 mg d'EPS.g⁻¹ de MVS. Les auteurs suggèrent ainsi l'importance de la présence des EPS vis-à-vis de l'hydrophobicité relative des biofilms. Les interactions hydrophobes sont attribuées à des molécules portant des groupements hydrophobes ou à des structures de repliement moléculaire qui induisent des régions hydrophobes. Les molécules concernées sont essentiellement les protéines portant des acides aminés à chaînes carbonées ou aromatiques et dans une moindre mesure les polysaccharides à cycles furanose ou pyranose.

Compte tenu de ces études, les interactions hydrophobes entre les différents composants des granules semblent jouer un rôle dans le maintien de la structure biologique agrégée. La structure des granules découlerait donc alors d'interactions ioniques et hydrophobes complémentaires. Les connaissances sur ce sujet ne sont toutefois pas assez avancées pour déterminer de quelle manière exactement ces différents paramètres interviennent et il est donc nécessaire de poursuivre les investigations afin de mieux comprendre quels motifs moléculaires interviennent dans la mise en place des propriétés physiques des agrégats de type granule.

V.3 Stratification biochimique des granules

Comme on l'a vu précédemment, la répartition des microorganismes au sein du granule n'est pas homogène mais varie en fonction de la profondeur et des gradients de concentration en substrats (donneurs et accepteurs d'électrons). Certains travaux suggèrent que cette stratification de populations microbiennes, due à des limitations de transferts de matière au sein des agrégats peut être couplée à une stratification de la composition de la matrice d'EPS. Les EPS du cœur du granule peuvent en effet être plus impliqués dans la résistance aux phénomènes de rupture de l'agrégat alors que celles situées en périphérie auront d'avantage un rôle dans la résistance au détachement de surface. De plus, les compositions variables en polymères de la matrice des granules peuvent, à leur tour, influencer sur les transferts de matière et donc sur les croissances différentielles des microorganismes colonisant les agrégats.

Dans la littérature, on trouve quelques articles étudiant la localisation de différents types d'EPS par marquage spécifique par des molécules fluorescentes. Ainsi, en 2008, Adav et Lee observent au microscope confocal des granules alimentés par de l'eau usée synthétique présentant un rapport C/N de 1,4 et marqués par différentes molécules.

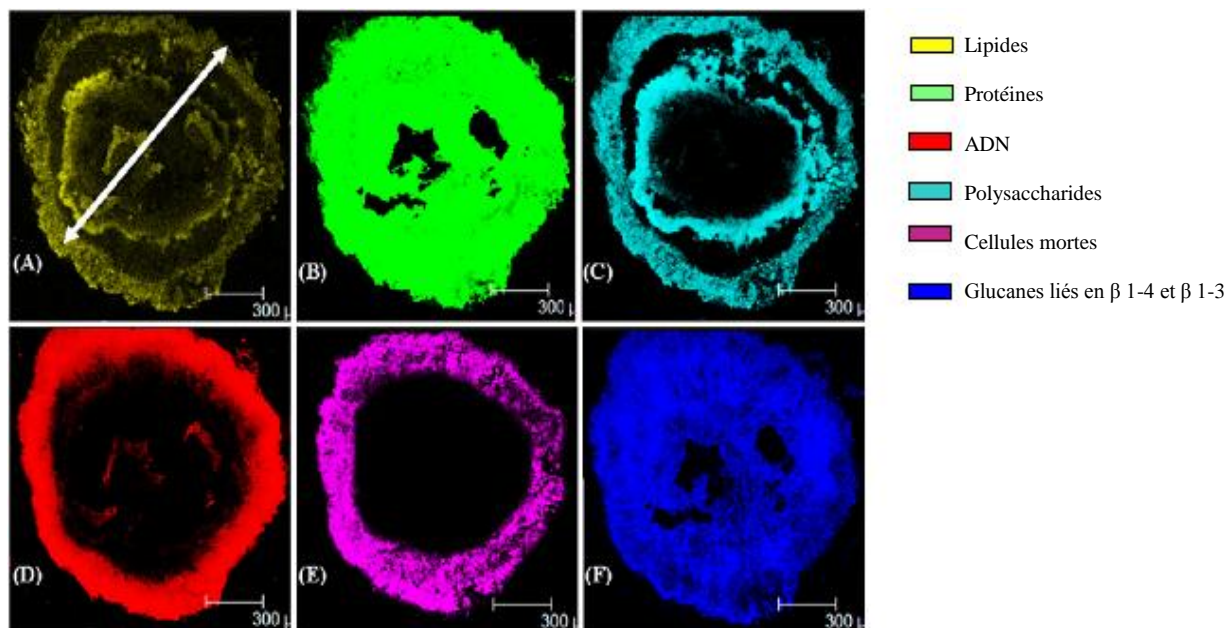


Figure 40 : Image d'un granule marqué observé au microscope confocale à balayage laser (CLSM). (A) jaune : lipide (rouge de nil) ; (B) vert : protéine (FITC) ; (C) rouge : acides nucléiques (SYTO 63) ; (D) bleu clair : α -polysaccharides (concanavoline A) ; (E) rose : cellules mortes (SYTO bleu) ; (F) bleu foncé : β -polysaccharides (blanc de calcofluor). Adav et Lee. (2008). La ligne blanche sur l'image A correspond au diamètre le long duquel les auteurs de l'article mesurent les intensités des différents marquages.

Suite à ces marquages, on peut voir que les polysaccharides sont majoritairement concentrés dans les parties les plus externes de l'agrégat (figure 40). On observe une présence beaucoup plus équitablement répartie des protéines et des lipides dans l'ensemble de la structure. Lors de cette expérience, le blanc de calcofluor est utilisé comme marqueur spécifique des β -polysaccharides (bleu foncé) car il forme des ponts hydrogènes avec les liaisons β 1-4 et β 1-3 des glucanes. Il marque la quasi-totalité du granule, ce qui est étrange lorsqu'on compare son marquage à celui de la concanavoline A (en bleu clair). En effet, cette lectine marquant l'ensemble des résidus glucose, elle devrait également marquer tous les β glucanes qui s'associent au calcofluor. Ces divergences de marquage des polysaccharides au cœur des granules peuvent s'expliquer soit par une spécificité de la concanavoline A pour les α -glucanes qui ne reconnaît alors pas les β -glucanes, soit par un marquage anarchique et non spécifique de l'ensemble du granule par le blanc de calcofluor.

Outre des spécificités de reconnaissance parfois mal connues, des problèmes liés à la diffusion de ces marqueurs fluorescents de taille relativement importante peuvent fausser les observations. En effet, selon Tsai et al. (2008), les résultats obtenus sur des granules entiers marqués au SYTO 63 ne peuvent pas être pris en compte car ce marqueur pose des problèmes de diffusion dans les granules et ne colore pas à des profondeurs supérieures à 60 μm .

Les données de Adav et Lee (2008) sont confirmées partiellement par McSwain et al. (2005) qui analysent la distribution des protéines et polysaccharides au sein de granules alimentés par du milieu synthétique avec un rapport C/N de 10,7 et préalablement coupés au cryomicrotome avant dépôt des sondes fluorescentes. Ces auteurs trouvent également une répartition des protéines (marquées par du FITC) dans l'ensemble du granule avec toutefois quelques hétérogénéités de distribution (figure 41). En ce qui concerne les polysaccharides, ces auteurs confirment la localisation externe des α -polysaccharides (marqués par de la concanavoline A) déjà établie par Adav et Lee (2008).

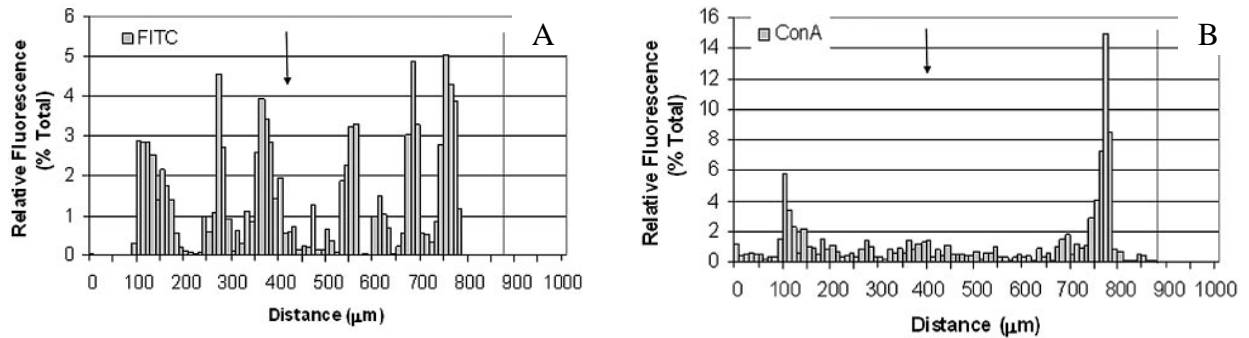


Figure 41 : Fluorescence relative de chaque épaisseur d'une cryosection de 20 µm a un granule. La surface au granule est identifiée par une ligne verticale. Les protéines sont marquées au FITC (A) et les résidus mannose ou glucose des polysaccharides à la concanavaleine A (B) McSwain et al. (2005).

En outre, en plus de cette stratification, il est possible que la matrice d'EPS des granules présente d'autres hétérogénéités. Il est possible en effet que les caractéristiques de cette matrice changent aux abords des microcolonies de bactéries, et également d'une microcolonie à l'autre si les espèces microbiennes diffèrent. C'est ce qu'ont observé Lemaire et al. (2008b) dans le cas de leurs granules aérobies alimentés par des eaux résiduaires synthétiques dotées d'une DCO de 350 mg.L⁻¹ (acétate), et d'une concentration en ammonium de 35 mg.L⁻¹ et de phosphate 23 mg.L⁻¹. Ces microcolonies ont été étudiées plus précisément, dans le cas des biofilms, par Lawrence et al. en 2007 qui les observent au microscope confocal après marquage de différents types de polysaccharides par des lectines. Lors de cette étude, les auteurs observent un enrobage complexe des polymères autour des bactéries composé de différents types de polysaccharides (figure 42).

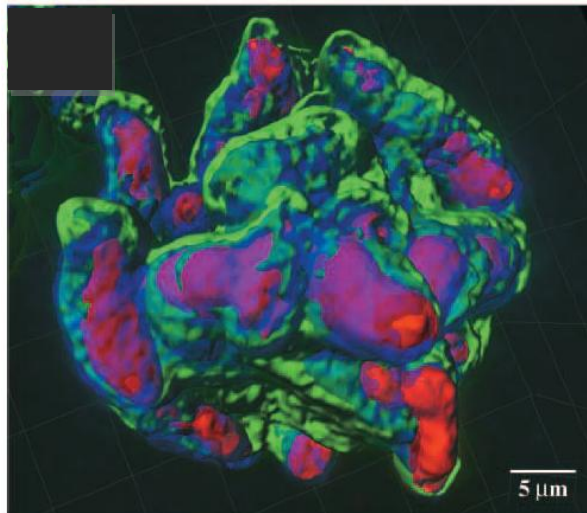


Figure 42 : Observation en microscopie confocale d'une microcolonie bactérienne de biofilm (Lawrence et al., 2007). En rouge, marquage des glycoprotéines par la lectine *Cicer Ariatinum* conjuguée à du Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate (TRITC), en bleu, marquage du fucose par la lectine *tetragonolobus purpureas* conjuguée à de la cyanine 5, et en vert, marquage des oligomères de N-Acétylegalactosamines par la lectine *solanum tuberosum* conjuguée à du FITC.

Enfin, en réalisant des mesures de tonométrie (mesure des déformations consécutives à une contrainte) en différents points d'un biofilm de *Proteus mirabilis*, Lahaye et al. (2007) mettent en évidence des hétérogénéités de propriétés viscoélastiques au sein de ces microcolonies, entre le centre et la périphérie des micro-colonies, le centre apparaissant moins élastique que le bord.

Au sein des agrégats bactériens comme les granules, ils existent donc de grandes hétérogénéités dans la répartition des différents types d'EPS. Ces hétérogénéités, étroitement liées aux activités métaboliques des microorganismes des agrégats, vont bien sûr avoir une influence sur les propriétés physiques des granules à l'échelle locale comme à l'échelle globale.

Conclusions

VI.1. Conclusion de l'étude bibliographique

Cette étude bibliographique nous a tout d'abord permis de mieux comprendre comment les populations bactériennes des granules aérobies permettaient l'établissement des activités épuratrices nécessaires au traitement des eaux usées. En particulier, nous avons vu que la densité caractéristique de ces agrégats, en induisant des limitations de transferts de nutriments et d'oxygène au travers de la matrice d'EPS des granules, permettait le développement d'espèces bactériennes variées aux métabolismes complémentaires.

Cependant, ces propriétés microbiologiques complexes et ces particularités physiques spécifiques aux granules vont également rendre plus difficile la caractérisation des propriétés physico-chimiques des substances polymériques de la matrice d'EPS des agrégats de type granulaires. En effet, nous avons vu au cours de cette étude que les nombreuses approches qui ont été initiées pour caractériser les physiquement et chimiquement les substances polymériques de la matrice se heurtaient souvent à la grande diversité des molécules de cette matrice, et également à la grande densité des agrégats granulaires qui est souvent un obstacle pour les méthodes d'analyse. En particulier, ces recherches ont mené au développement de différentes techniques d'extraction des EPS. Nous avons vu ainsi que les protocoles d'extraction utilisés pouvaient être répartis en deux catégories : les méthodes douces qui ne posent pas de problème de lyse cellulaire mais ne permettent pas la récupération de grandes quantités d'EPS, et des méthodes dures dont le rendement est beaucoup plus élevé mais qui présentent un grand risque de contamination par du contenu bactérien (table 1). La combinaison de méthodes est une solution pour augmenter les rendements d'extraction au delà de 500 mg.g^{-1} mais attention à contrôler la lyse. Afin d'optimiser au mieux une stratégie d'extraction, il faudra donc faire un compromis entre l'efficacité de la méthode et la préservation de l'intégrité cellulaire.

Ces extractions permettent ensuite d'analyser la composition de la matrice d'EPS. Celle-ci est essentiellement composée de protéines et de polysaccharides mais avec une disparité importante des rapports PN/PS qui varient entre 1 et 8 selon les études. Ces variations sont liées aux diverses méthodes d'extraction, aux techniques de dosage et à la lyse cellulaire qui augmente le rapport par relargage des composés intracellulaires essentiellement protéiques. Elle peut également provenir de la diversité des conditions de culture des agrégats qui vont influencer la nature des populations bactériennes présentes dans les granules et ainsi induire des différences dans la composition des EPS de la matrice.

En ce qui concerne la caractérisation à l'échelle moléculaire des polymères extraits, quelques travaux ont été réalisés par analyse en chromatographie liquide. Ainsi, des empreintes de tailles ont été obtenues par chromatographie d'exclusion stérique sur des boues granulaires anaérobies prélevées sur sites industriels (Simon et al. 2009). Les spectres infra-rouge réalisés sur les extraits provenant des mêmes installations ont confirmé la présence de fonctions chimiques spécifiques des protéines et polysaccharides mais ont aussi révélé la présence de substances humiques et d'acides uroniques (D'Abzac et al., 2010a et b). Cependant, la grande diversité des EPS qui composent ces extraits rend difficile les interprétations des analyses moléculaires et les données obtenues permettent d'obtenir seulement des informations globales sur la composition en EPS de la matrice.

Il pourrait donc être intéressant de fractionner les EPS avant de les étudier. C'est la stratégie adoptée par Seviour et al. (2009b) qui séparent les polysaccharides des autres composants des EPS grâce à un protocole d'enrichissement par précipitation acide. Cela leur permet d'analyser séparément le pouvoir gélifiant de cette fraction polysaccharidique et d'en déduire ainsi leur rôle dans la cohésion des granules. Toutefois, cette activité de gélification est analysée pour des concentrations importantes, probablement très supérieures à celles existant *in situ*.

Des études ont également été menées en soumettant les granules à des incubations dans différents agents chimiques ou en présence d'enzymes. Les traitements par les enzymes incluent essentiellement des activités de type protéase ou glycosidase. La digestion spécifique de protéines ou polysaccharides susceptibles d'établir des interactions intermoléculaires devrait alors permettre de mieux définir leur distribution spatiale ainsi que leur contribution à la structure des granules. De cette manière, Seviour et al. (2009a) mettent en évidence le rôle prépondérant des α (1-4) glucanes en mesurant sur leur granules une baisse significative du paramètre d'élasticité suite à la digestion par une α -amylase.

De même, Adav et Lee. (2008) parviennent à provoquer une désintégration complète de leurs agrégats granulaires après digestion par une β -amylase. Ils en concluent que les β -polysaccharides sont une source importante de cohésion, mais cette déduction est due à une erreur dans la spécificité de l'enzyme. En effet, les β -amylases ne digèrent pas les β -polysaccharides, comme le supposent Adav et Lee. (2008), mais détruisent les liaisons α (1-4) glucanes des α -polysaccharides. La distinction entre α et β -amylases ne provient en fait pas de la spécificité pour le substrat, mais du mécanisme enzymatique, les β -amylases ayant une activité exogène (digestion de la liaison osidique à partir de l'extrémité réductrice de la chaîne de glucoses liés en α 1-4) alors que les α -amylases ont une activité endogène (digestion au hasard à l'intérieur la chaîne de glucose liés en α 1-4). Par conséquent, les résultats de Adav et Lee. (2008) sont en accord avec ceux de Seviour et al. (2009a) dans la mesure où ils confirment l'importance des α (1-4) glucanes. Cependant, sachant que les α et β -amylases sont spécifiques des mêmes substrats, il est étrange que dans l'étude de Adav et Lee. (2008), l'utilisation d'une β -amylase entraîne une déstructuration importante alors que l'utilisation d'une α -amylase n'affecte pas l'intégrité du granule. Inversement, dans l'étude de Seviour et al. (2009a), la cohésion du granule est diminuée après digestion par l' α -amylase alors qu'elle n'est pas affectée après digestion par la β -amylase.

Seviour et al. (2009a), déduisent également de digestions par une protéase qui abaisse le paramètre d'élasticité mesuré sur leurs granules, que les protéines ont également un rôle important dans les agrégats granulaires vis-à-vis de la cohésion. Ce rôle présumé des protéines est en accord avec les résultats de Zhang et al. (2007) qui remarquent que la densification des granules s'accompagne d'une augmentation de la proportion des protéines dans les EPS. Il est également logique de penser que les protéines vont jouer un rôle important dans la matrice d'EPS des granules puisque la majorité des études réalisées indiquent que ces polymères en sont le composé majoritaire. C'est en particulier le cas lors de l'étude de Zhang et al. (2007) qui montrent un rapport PN/PS de 4,9 et de l'étude de McSwain et al. (2005), pour qui le rapport PN/PS oscille entre 6 et 8. De plus, comme le montrent quelques autres études, l'observation microscopique de granules aérobies cultivés dans différentes conditions a permis de visualiser la répartition non homogène des EPS dans les agrégats avec un cœur majoritairement protéique dans une enveloppe composée de polysaccharides et de protéines (Adav et Lee, 2008 ; McSwain 2005). Cette répartition particulière, est à mettre en lien avec la stratification des microorganismes.

Deux types de polymères, les protéines et les alpha-glucanes, semblent donc être davantage impliqués dans la structuration et la cohésion du granule. D'autres expérimentations sont maintenant nécessaires pour savoir quels sont les motifs ou groupements chimiques portés par ces molécules susceptibles d'établir des liaisons inter ou intra molécules au sein de la matrice.

Une piste de recherche prometteuse concerne l'implication de groupements anioniques et l'existence de liaisons de type ponts ioniques médiés grâce à la présence de cations divalents. Même si sur ce point, aucune étude n'a été réalisée sur des agrégats denses comme les granules, certains travaux viennent quant à eux montrer l'importance des cations divalents comme le calcium dans la matrice d'EPS pour la cohésion de floes. Sobeck and Higgins (2002) ont ajouté des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} jusqu'à des concentrations de 15 méq.L^{-1} à des boues activées ce qui a provoqué l'épaississement d'un facteur cinq par bio-floculation des boues activées alors que, à l'inverse, la présence de Na^+ , dans les mêmes proportions, a entraîné une défloculation des boues.

Ce phénomène peut s'expliquer par un pontage par cations divalents entre polymères anioniques qui stabiliserait la structure de la matrice d'EPS. Ce pontage peut avoir lieu entre des protéines possédant des acides aminés chargés négativement (acides glutamiques et aspartiques, table), ou entre polysaccharides contenant des oses anioniques (alginates ou carraghénanes par exemple). En particulier, la capacité de l'alginate à former des gels résistants en présence de calcium est décrite par Sobeck et Higgins en 2002. Sheng et al. (2006) confirment ces résultats en montrant que la sensibilité des floccs augmente lorsqu'ils sont mis en contact avec de l'EDTA, un chélateur de cation divalents. Dans le cas de granules anaérobies utilisés pour le retraitement d'eaux usées dans des installations industrielles étudiés par D'abzac et al. (2010a et b), on observe aussi une grande sensibilité à l'EDTA. En effet, on remarque dans ces études que l'utilisation d'une incubation dans de l'EDTA 2 % pendant 3h pour l'extraction d'EPS est très efficace. Selon les résultats obtenus, ce traitement permet d'augmenter les quantités extraites de 155 % par rapport au procédé classique utilisant la CER.

La description des matrices des granules comme des gels composés d'EPS permet de mieux comprendre le lien entre les caractéristiques chimiques des EPS à l'échelle microscopique, et les propriétés physiques des granules à l'échelle macroscopique. L'étude des gels montre en effet comment les différents polymères peuvent interagir entre eux et s'associer pour former un matériau cohésif dont les propriétés sont proches de celles de la matrice d'EPS des granules. Dans ce cadre, ces études nous permettent également de comprendre quels sont les facteurs importants pour obtenir une structure cohésive. D'après les résultats des expériences réalisées par Shimada et Matsushita (1980) avec 4 types de protéines présentant des caractéristiques physico-chimiques très différentes (taille, point isoélectrique, solubilité dans l'eau, structures tertiaire et quaternaire), on peut conclure que toutes les protéines peuvent former des gels. Même l'albumine de sérum qui fait partie de la famille des globines très hydrophiles peut coaguler à des concentrations de 0,1 % soit 1 g/L. Cependant, les propriétés chimiques des polypeptides vont avoir un impact élevé sur la cohésion de ces gels. Il semble, en particulier, que le taux d'hydrophobicité soit un facteur favorable, ainsi que l'absence de charge globale positive ou négative des polymères. Des protéines dénaturées et des conditions de pH proches de leur point isoélectrique auront ainsi plus tendance à former des gels résistants.

Dans le cas des polysaccharides, les réseaux sont souvent organisés (double hélice pour les carraghénanes, boîte à œufs de l'alginate) et la capacité à former des gels est accrue si les oses sont chargés (acides uroniques des alginates ou de la pectine, sulfates des carraghénanes). La description des modèles de gels protéiques et/ou polysaccharidiques ont ainsi permis de mieux comprendre l'influence de l'environnement chimique des granules (pH, température, force ionique et présence de certains cations comme notamment le calcium), sur les mécanismes chimiques à l'origine de la cohésion des agrégats.

VI.2. Objectifs de la thèse

L'objectif de notre étude est de comprendre comment les EPS de biomasses granulaires, de par leurs natures et leurs propriétés chimiques permettent de structurer les agrégats denses et d'assurer leur cohésion.

Le problème qui se pose dans l'étude des EPS des granules est avant tout leur diversité et leur complexité. De plus, la distribution quantitative et qualitative des EPS est influencée par les conditions environnementales qui conditionnent l'écologie microbienne et les propriétés chimiques des molécules (charge, hydrophobicité).

Afin de pouvoir étudier ces polymères, deux approches peuvent être envisagées : une extraction des EPS permettant l'analyse *in vitro* des caractéristiques biochimiques et physico-chimiques de ces molécules ou une étude *in situ* après marquage et observation microscopique des EPS présents au sein du granule. Nous proposons de mener les deux stratégies en parallèle au cours de la thèse. En effet, la stratégie par extraction permettra d'obtenir des éléments quantitatifs après dosage des EPS extraits et de pouvoir les fractionner avant d'analyser leurs propriétés par des techniques de chromatographie. L'analyse de la distribution de ces EPS au sein du granule permettra quand à elle d'appréhender l'impact du micro-environnement local et le lien possible entre stratification biochimique et stratification microbienne.

En ce qui concerne l'approche *in vitro*, nous avons vu que l'extraction des EPS est souvent problématique soit parce que son rendement est faible, soit parce qu'elle provoque la libération de composés intracellulaires qui viennent contaminer les échantillons. Des stratégies ciblant spécifiquement plusieurs types d'interactions ont été envisagées afin d'augmenter les quantités d'EPS extraites mais aussi la diversité des EPS agrégés dans la matrice. C'est la stratégie qu'emploient Ras et al. en appliquant successivement à des floccs (2008a) ou à des biofilms (2011), une étape de déstructuration mécanique suivie d'une étape d'extraction ciblant préférentiellement des composés hydrophobes et enfin une étape d'extraction ciblant les composés ioniques.

La première étape de cette étude consistera à appliquer cette stratégie d'extraction multi-méthodes au cas des granules. Compte-tenu des propriétés physiques de ces agrégats denses, nous travaillerons à la mise au point d'un procédé d'extraction combinant des méthodes physiques et des méthodes chimiques relativement douces pour éviter la lyse mais surtout permettre d'extraire des EPS présentant des propriétés chimiques variées. Ainsi, des EPS faiblement liées pourraient être extraites lors des étapes de fragilisation mécanique alors que les EPS liées par des interactions hydrophobes et ioniques seraient libérées après action plus ou moins spécifique de détergents et de chélateurs de cations. Beaucoup de travaux décrivent en effet le rôle du calcium comme agent pontant d'EPS anioniques et il paraît donc judicieux d'utiliser un chélateur de cations divalents. En ce qui concerne le caractère hydrophobe, c'est généralement l'hydrophobicité de surface des cellules qui est analysée et aucune étude n'a pu mettre en évidence la présence d'EPS hydrophobes au sein des granules. Nous proposons d'utiliser un détergent non ionique pour favoriser l'extraction des EPS hydrophobes s'ils sont présents dans la matrice et enrichir leur représentativité lors d'une étape d'extraction spécifique.

Dans un second temps, nous chercherons à caractériser les molécules extraites des granules. Leur nature biochimique (protéines, sucres) mais aussi les propriétés physico-chimiques des EPS extraites sera analysée (taille, charge, hydrophobicité). Le fractionnement des EPS déjà initié par chaque étape du protocole d'extraction multi-méthode sera pour cela poursuivi par des techniques plus résolutive de chromatographie liquide. A ce stade, nous effectuerons l'analyse différentielle des propriétés chimiques des EPS extraites de floccs peu denses avec celles des EPS extraites de granules. En effet, parmi les différents types d'EPS et déterminants chimiques que nous aurons caractérisés, nous chercherons à identifier ceux qui sont spécifiques de la structure granulaire afin de les étudier en priorité.

Au cours de la dernière phase du travail, nous chercherons à savoir si les EPS mis en évidence lors des étapes d'extraction et de fractionnement peuvent jouer un rôle clef dans l'agrégation, et nous essayerons de comprendre comment ils remplissent ce rôle. A ce stade de l'étude, l'approche *in situ* permettra de visualiser la structure des granules avant et après des traitements spécifiques visant à altérer un type moléculaire ou un caractère chimique.

Outre l'analyse des images prises au microscope, il conviendra de quantifier l'impact de ces traitements sur la cohésion des granules. Pour cela, l'utilisation de contraintes de cisaillement contrôlées, générées par une enceinte agitée pourrait être couplée à la caractérisation biochimique des EPS relarguées ainsi qu'à leur observation par microscopie.

Un travail similaire a déjà été réalisé par d'autres équipes lors de l'étude des propriétés cohésives et de la résistance des granules après digestion des EPS par action enzymatique (Seviour et al., 2009a). Cependant, seules des enzymes présentant des activités polysaccharidiques peu diversifiées (uniquement α et β – amylases) ont été utilisées et nous proposons d'élargir les cibles moléculaires à d'autres polysaccharides et notamment à ceux présentant un caractère anionique (sucres uroniques).

Ces résultats pourront être reliés aux conditions de culture et de formation des granules au niveau du réacteur afin d'améliorer la stabilité des boues granulaires à travers la gestion de certains paramètres environnementaux tels que le pH, la force ionique, l'alimentation en carbone et en azote et éventuellement l'utilisation d'additifs.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

I. Production des granules en réacteur SBR

I.1. Le réacteur SBR

Les granules ont été développés dans deux réacteurs de type « airlift » de 1,07 m de hauteur et 0,15 m de diamètre, présentant un volume utile de 17 L. Ces réacteurs ont été inoculés par des boues activées provenant de la station d'épuration de Labège (31). La composition des effluents synthétiques utilisés pour les alimenter est présentée dans la table 3.

Table 3 : Conditions d'alimentation des 2 réacteurs airlift (R1 et R2) utilisés dans notre étude (thèse de Ahlem Filali (2011)).

	R1	R2
Ratio d'échange volumétrique (%)		47
Temps de rétention hydraulique (h)		8,5
Charge organique volumique (kg COD m ⁻³ j ⁻¹)		2,8
Charge en ammonium volumique (kg N-NH ₄ j ⁻¹ m ⁻³)		0,14
Charge en nitrate volumique (kg N-NO ₃ j ⁻¹ m ⁻³)	0,28	0
Charge en phosphate volumique (kg P-PO ₄ j ⁻¹ m ⁻³)		0,08
Vitesse superficielle du N ₂ (cm s ⁻¹)	1,1	0,56
Vitesse superficielle de l'air (cm s ⁻¹)	1,1	0,94
Température (°C)		20 ± 2
pH	7,5 – 9,2	7,2 - 8,5

La source de carbone choisie ici est un mélange diversifié contenant de l'acétate, du glucose, de l'éthanol et du propionate (25 % chacun).

Les réacteurs sont alimentés selon le principe d'un réacteur en batch séquentiel ou « Sequenced Batch Reactor » (SBR). La biomasse est alors aérée et agitée par insufflation d'air à partir du bas du réacteur. Le SBR fonctionne selon des cycles de 4 heures : le réacteur est décanté pendant 30 min, purgé pendant 30 min, alimenté pendant 15 min puis passe en phase anoxique/anaérobie par injection de N₂ pendant 20 min et est enfin aéré pendant 2 h 25. La figure 43 représente la succession de ces étapes.

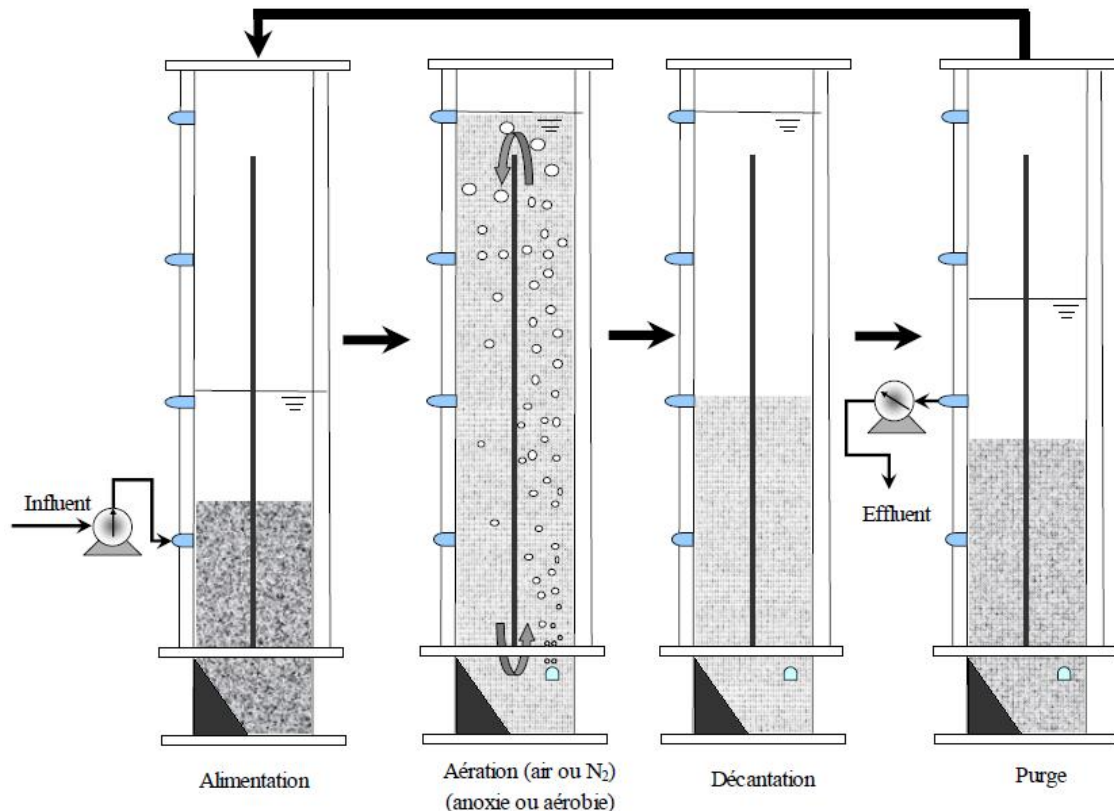


Figure 43 : Fonctionnement des réacteurs en batch séquentiel ou « sequenced batch reactor » (SBR)

Les suivis de la composition du milieu de culture en NH_4^+ / NO_3^- / NO_2^- et DCO à l'entrée et à la sortie permettent de caractériser les activités microbiennes : élimination du carbone et de l'azote (étape nitrification et dénitrification).

La DCO est un paramètre servant à mesurer la concentration en matière organique et en composé minéraux réducteurs d'une solution. Ce paramètre correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder totalement les substances organiques et minérales de l'eau. Elle permet d'évaluer la charge polluante des eaux usées. L'analyse de la DCO est basée sur la norme AFNOR NF T 90-101 (norme AFNOR-méthodes., 1994). Pour cette mesure, on réalise une oxydation par le bichromate de potassium en milieu sulfurique dilué, à chaud (194 °C pendant 2h00) en présence d'un catalyseur, le sulfate de mercure II, et sous reflux pour récupérer les matériaux volatils. On évalue la quantité d'oxygène (en mg.L^{-1}), utilisée par les réactions d'oxydation en déterminant la quantité d'oxydant résiduelle à l'aide de sels de Mohr.

Les concentrations en NH_4^+ / NO_3^- / NO_2^- sont analysées par chromatographie d'échange d'ions (CI25, 2003, Dionex, Etats-Unis), après filtration des échantillons à travers un filtre acétate à pores de 0,2 μm de diamètre.

Les conditions d'alimentation des deux réacteurs sont différenciées afin d'étudier les effets de l'alternance des conditions anoxique / aérobie dans le réacteur R1 et anaérobie / aérobie dans le réacteur R2.

Dans le réacteur R1, le métabolisme anoxique est permis par ajout de nitrates à raison de 0,28 kg par jour et par m^3 . Dans les deux cas, un rapport C/N relativement bas (20 dans le cas de R2 et 7 dans le cas de R1) est utilisé pour favoriser l'implantation des bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes.

Les caractérisations de la matrice d'EPS de ces granules sont effectuées après une durée minimum de 50 jours de culture suivant ces paramètres de manière à atteindre un état suffisamment stationnaire pour pouvoir exploiter les résultats.

I.2. Propriétés des boues granulaires

Les conditions particulières de fonctionnement et d'alimentation des réacteurs font que ceux-ci produisent un mélange mixte de granules et de flocons. Dans le réacteur R1, les granules correspondent alors à 80 % de la masse totale d'agrégats et dans le réacteur R2, ils représentent 98 % du total. Afin d'étudier les propriétés des agrégats et de leur matrice d'EPS, des prélèvements sont effectués en fin de phase d'aération (figure 43).

I.2.1. Mesures des Matières Sèche (MS) et Matières Volatiles (MV)

Afin de mesurer la masse de matière sèche (MS) d'un échantillon de boues granulaires prélevées du réacteur, on en dépose un volume connu sur une coupelle préalablement tarée, et séchée à l'étuve à 105 °C pendant 24 h.

Ce culot est ensuite placé dans un four à 550°C pendant 2 h. Le résidu obtenu est alors pesé. La masse de matières volatiles (MV) est déterminée par différence de masse entre la fraction des MS et la fraction du résidu après combustion.

$$m_{MV} = m_{MS} - m_{\text{mesurée}}$$

I.2.2. Matières En Suspension (MES) et Matières Volatiles en Suspension (MVS)

Une prise d'essai, entre 10 et 100 mL selon l'échantillon est centrifugée à 12 000 g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse BECKMAN réfrigérée à 4°C.

Les MES correspondent à la masse de MS contenue dans l'échantillon ramenée au volume initial de cet échantillon. Le culot est donc placé dans une coupelle préalablement tarée, et séché à l'étuve à 105 °C pendant 24 h. Le poids du résidu sec est rapporté au volume initial d'échantillon et indique la quantité de Matières En Suspension ou MES.

$$MES = MS_{\text{mesurée}}/V_{\text{initial}}$$

Les MVS quant à eux correspondent à la masse de MV contenue dans l'échantillon ramenée au volume initial de cet échantillon. Ce culot est donc ensuite placé dans un four à 550°C pendant 2 h. Le résidu obtenu est alors pesé. Les matières volatiles en suspension (ou MVS) sont déterminées par différence de masse entre la fraction des MES et la fraction du résidu après combustion, ramenée au volume initial de l'échantillon.

$$MVS = MV_{\text{mesurée}}/V_{\text{initial}}$$

I.2.3. Index de décantabilité (SVI)

Le SVI est le volume de boue (ou de granules) décantée en un temps donné (t) rapporté à la masse de MVS. Il s'exprime en mL de boue par g de MES. Il s'agit d'un indicateur de la densité des boues.

Ce paramètre est mesuré pour différents temps de décantation. On considère que les SVI₅ et SVI₃₀ (pour des temps t de décantation de respectivement 5 et 30 minutes) sont représentatifs des caractéristiques des agrégats.

1 L de boues maintenues sous agitation sont versées dans une éprouvette graduée. Elles sont ensuite laissées décantées pendant le temps t . Le volume V occupé par la boue est mesuré. Et le SVI_t est déduit directement par la formule suivante :

$$SVI \text{ (mL/g)} = \frac{\text{Volume après décantation de 1L de boue (mL/L)}}{MES \text{ (g/L)}}$$

II. Caractérisation des granules

Après prélèvement des boues du réacteur contenant un mélange de floccs et granules, les deux formes d'agrégats peuvent ensuite être séparées par une méthode de tamisage sur un tamis avec un seuil de coupure de 315 μm .

II.1. Paramètres morphologiques

Une caméra XCD SX90 (SONY) et le logiciel Visilog (Noeis) sont utilisés pour photographier des granules disposés dans du tampon PBS 1 X pH 7,5 dans une boîte de pétri. Les photographies sont effectuées soit en fond noir avec éclairage modéré par au dessus ce qui permet de bien distinguer les détails de la surface des agrégats et notamment d'éventuelles excroissances, soit avec un éclairage puissant, par en dessous, au travers d'une feuille de papier blanc ce qui permet d'observer uniquement les parties denses des agrégats avec un fort contraste et facilite les mesures des dimensions des granules.

Ces dimensions sont mesurées à l'aide des fonctionnalités de traitements du logiciel Visilog (Noeis) sur les photographies en fond blanc éclairée par en dessous (de 50 à 100 particules par cliché).

Dans un premier temps, le logiciel permet de « binariser » les images en nuances de gris utilisées. Sur les images, l'intensité de noir de chaque pixel est codée par une valeur entre 1 et 256 (codage nuance de gris 8 bits). La « binarisation » consiste à séparer l'image en 2 parties séparées par un seuil d'intensité choisi par l'utilisateur entre 1 et 256. Sur la figure 44, les parties « noires » apparaissent en rouge et les parties « blanches » restent blanches et grises.

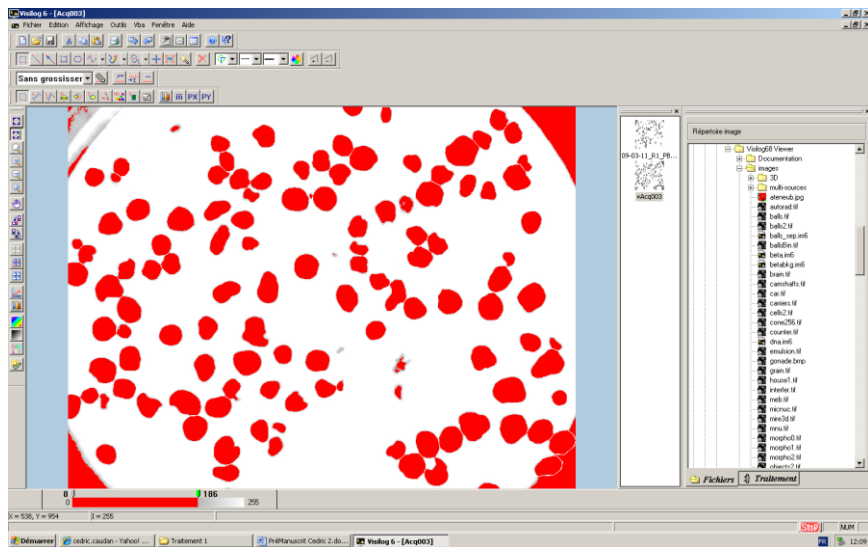
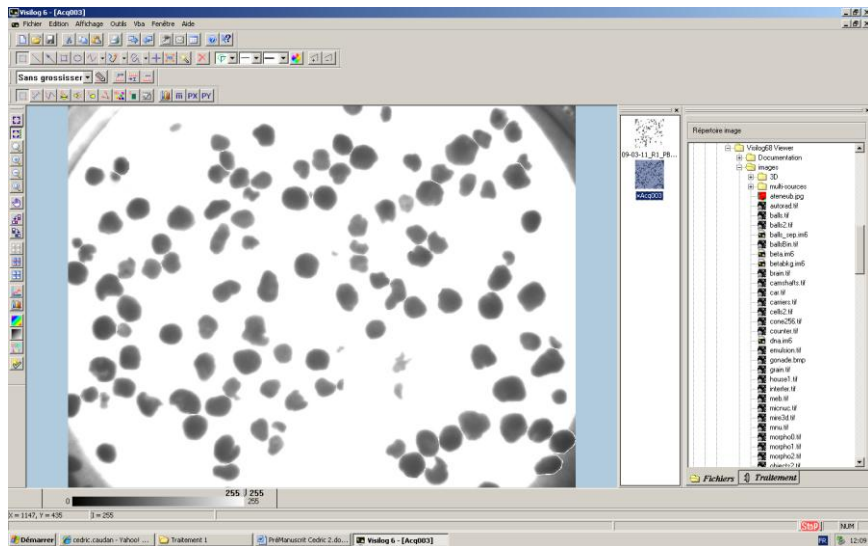


Figure 44 : « Binarisation » des photographies de granules en fond blanc avec éclairage par en dessous pour mesures des dimensions des agrégats par le logiciel Visilog.

Cela permet de notifier au logiciel où sont les surfaces correspondant aux agrégats. Un programme automatique traite ensuite les images automatiquement. Les granules tronqués par la photographie ou de tailles trop réduites (diamètre inférieur à 1 mm) et correspondant à des débris sont éliminés. Les surfaces restantes sont utilisées pour déduire les dimensions des granules. On mesure ainsi :

- La longueur de chacun des agrégats (distance entre ses deux extrémités les plus éloignées)
- Le périmètre (P)
- La surface (S)

Un facteur de forme est également déduit du périmètre et de la surface mesurée. Ce paramètre permet de différencier les particules au pourtour régulier et irrégulier. Elle vaut 1 dans le cas d'un disque parfait et augmente si la forme est différente. La formule suivante permet de le calculer :

$$\text{Facteur de forme} = \phi = (P)^2 / (4\pi S)$$

Une valeur de diamètre d est également déduite à partir de l'aire mesurée et de la formule :

$$d = 2 \times (S/\pi)^{0,5}$$

II.2. Observation des granules en microscopie confocale

II.2.1. Fixation et coupe des agrégats

La fixation des granules se fait par ajout d'un volume de PBS stérile (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, 1,76 mM KH₂PO₄) pour 3 volumes de PFA (4%) à 5 à 10 agrégats de sorte que les échantillons soient recouverts. Les échantillons sont ensuite laissés une nuit à 4°C.

Au bout d'un minimum de 12 h, on enlève le surnageant à l'aide d'un pipetteur équipé d'un cône stérile et on effectue 10 lavages au PBS stérile.

Après ces lavages, on ajoute 500 µL de PBS stérile et 500 µL d'éthanol 95% pour la conservation et on conserve les échantillons fixés à -20°C jusqu'à la coupe.

Les coupes de 40 µm d'épaisseur sont effectuées à -20 °C à l'aide d'un cryomicrotome Leica CM3050 S (Leica Microsystems).

Les expériences de marquage sur les coupes réalisées doivent ensuite être immédiates pour ne pas altérer la qualité des observations.

II.2.2. Marquage spécifique de microorganismes (méthode FISH)

II.2.2.1. Sondes FISH utilisées

Le marquage FISH fonctionne grâce à l'hybridation d'oligonucléotides de 18 à 20 bases appelés sondes, marqués par un fluorochrome, à des séquences spécifiques des ARN ribosomiaux 16S des microorganismes ciblés. Il existe une grande diversité de spécificité de sondes. Il est possible, par exemple, de cibler l'ensemble des bactéries en utilisant des sondes « Eub », ou des espèces en particulier. La table 4 récapitule les séquences utilisées lors de cette étude.

Table 4 : Séquences des sondes FISH utilisées. Les solutions de marquage AOB, NOB et Eub mix contiennent un mélange de sondes présentant les différentes séquences correspondantes.

Cible	Souches	Nom	séquence
AOB	AOB	NSO 1225	5'- CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA -3'
	AOB	NSO 190	5'- CGA TCC CCT GCT TTT CTC C -3'
NOB	Nitobacter	nit 3	5'- CCT GTG CTC CAT GCT CCG -3'
	Avec sonde compétiteur	Comp nit 3	5'- CCT GTG CTC CAG GCT CCG -3'
	Nitrospira	ntspa662	5'- GGA ATT CCG CGC TCC TCT -3'
	Avec sonde compétiteur	Comp ntspa662	5'- GGA ATT CCG CTC TCC TCT -3'
Ensemble des bactéries (Eub mix)		EUB338 I	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT- 3'
		EUB338 II	5'-GCA GCC ACC CGT AGG TGT- 3'
		EUB338 III	5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT- 3'

Les sondes EUB 338 I, II et III permettent de marquer l'ensemble des bactéries (Amann et al.,1990 ; Daims et al., 1999). Ces sondes ont toujours été utilisées simultanément et sont regroupées sous le nom d'EUBmix.

Les sondes ciblant les bactéries NOB ont été associées à des sondes « compétiteurs » chargées de saturer les sites de séquences proches des organismes non ciblés afin de limiter le marquage aspécifique. Par conséquent, ces sondes ne sont pas marquées par un fluorochrome. Elles sont ajoutées directement sur le tampon d'hybridation en concentration équimolaire à celle des sondes.

II.2.2.2. Préparation de la «solution d'hybridation»

Chaque sonde FISH est caractérisée par un pourcentage de formamide spécifique à utiliser dans la solution d'hybridation. On prépare donc différentes solution de formaldéhyde en fonction des sondes utilisées.

Pour la sonde NSO 90, on utilisera 550 µL de formamide et 250 µL d'eau nanopure. Pour la sonde nit 3, on utilisera 400 µL de formamide et 400 µL d'eau nanopure. Et pour les sondes Eub (I, II et III), NSO 1225 et ntspa662, on utilisera 350 µL de formamide et 450 µL d'eau nanopure.

Les compositions des solutions d'hybridation sont les suivantes :

- 180 µL de NaCl 5 M
- 20 µL de Tris HCl 1 M
- 800 µL de solution de formamide à composition variable
- 2 µL de SDS 10% (à mettre en dernier)

II.2.2.3. Préparation de la solution de rinçage

La composition de la solution de rinçage varie également d'une sonde à l'autre en fonction du pourcentage de formamide utilisé dans la solution d'hybridation. Dans ce cas, on rajoute une quantité variable de NaCl 5 M. 100 μ L pour la sonde NSO 90, 460 μ L Pour la sonde nit 3, et 700 μ L pour les sondes Eub (I, II et III), NSO 1225 et ntspa662.

- 1 mL de Tris HCl 1 M
- 500 μ L d'EDTA 0,5 M
- NaCl 5 M (volume selon la sonde utilisée)
- Eau nanopure de manière à compléter à 50 mL
- 50 μ L de SDS 10%

La solution de rinçage est placée au bain-marie à 48°C afin de préserver la température des échantillons lors de son utilisation.

II.2.2.4. Hybridation par sonde FISH

On place la lame sur laquelle les coupes de granules ont été déposées 2 à 3 minutes au four à 46°C pour sécher les échantillons puis, on dépose successivement 100 μ L de solutions d'éthanol à 50%, 80% et 96% sur chaque échantillon. Entre chaque dépôt, on absorbe l'éthanol à l'aide d'un morceau de papier absorbant et on laisse agir 3 min.

On ajoute 10 μ L de solution d'hybridation sur chaque échantillon à marquer, puis 1 μ L de chaque sonde (FISH) utilisée. Les sondes FISH sont fournies par le fabricant aux concentrations d'utilisation. Chacune des sondes peut être liée à deux fluorophores différents : le FITC (excitation : 485 nm et émission : 520 nm), ou le cyanine 3 (excitation : 554 nm et émission : 568 nm). On utilise simultanément plusieurs sondes FISH lorsque celles-ci nécessitent la même concentration en formamide dans la solution d'hybridation. Si ce n'est pas le cas, il est nécessaire de répéter l'opération pour chaque sonde en commençant par les sondes nécessitant de fortes concentrations en formamide.

Le reste de la solution de marquage est aspiré à l'aide d'un morceau de papier absorbant. Le papier et la lame sont placés dans un tube de 50 mL fermé et le tout est placé au four à 46°C durant 1 h 30.

La lame est ensuite rincée avec un peu de solution de rinçage et placée dans un tube vide. L'ensemble est placé dans le bain-marie à 48°C durant 10 min. Enfin, la lame est rincée à l'eau et séchée à l'air libre.

II.2.3. Marquage des EPS

Ces marquages sont effectués par des incubations dans des solutions contenant les fluorophores. Il est possible d'effectuer ces marquages sur des coupes déjà marquées par la méthode FISH.

Le marquage des protéines est réalisé par fixation de l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC) sur les résidus amines secondaires ; excitation : 485 nm et émission : 520 nm. La solution de marquage contient le FITC à 0,4 g.L⁻¹, de l'acétone 0,23 g.L⁻¹ dans de l'eau distillée. L'incubation dure 60 min. Les solutions sont ensuite rincées 10 fois au PBS 1 X pH 7,5 stérile.

Le marquage des résidus glucoses et mannoses des polysaccharides est effectué par la concanavoline A hybridée à de la rhodamine (excitation : 543 nm et émission : 560 nm). La solution de marquage contient la concanavoline A à 0,1 g.L⁻¹ dans une solution de bicarbonate de sodium 10 mM pH 8,3. L'incubation dure 40 min. Les solutions sont ensuite rincées 10 fois au PBS 1 X pH 7,5 stérile.

On marque également l'ADN intra et extracellulaire par une solution commerciale de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole ; excitation : 360 nm et émission : 480 nm) contenant également une solution de montage afin de détecter les localisations des microorganismes dans les agrégats.

Les coupes marquées peuvent ensuite être conservées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

II.2.4. Microscopie confocale à balayage laser

Les images de marquages de granules sont obtenues en utilisant un microscope confocal Leica SP2 (Leica MICROSYSTEMS) mis à disposition par la plateforme d'imagerie du FR 3450 contrôlé par le logiciel Leica confocal software (Leica MICROSYSTEMS). Les objectifs qui ont été utilisés sont l'objectif 16X plan apochromatique et l'objectif 40 X plan apochromatique à immersion dans l'huile.

Dans le but d'éviter tout problème d'interférence, on décide de regrouper les marquages par ensemble de trois. Un marqueur dont le fluorophore est le FITC (FITC seul ou sonde FISH hybridé à une molécule de FITC), un marqueur hybridé à la rhodamine ou le cyanine 3, leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant très proches (Concanavaline A ou sonde FISH hybridé à une molécule de cyanine 3), et enfin, le marqueur DAPI.

On obtient grâce à ce procédé des images de trois fluorescences superposées codées en « RVB », c'est-à-dire, Rouge, Vert, Bleu (le codage conventionnel des images informatiques), le rouge correspondant à la fluorescence de la rhodamine ou du cyanine 3, le vert à la fluorescence du FISH (Seul ou hybridé à une sonde FISH), et le bleu à la fluorescence du DAPI.

II.2.5. Traitement informatique des images

Afin de mieux analyser la distribution de la fluorescence sur les coupes entières de granules, on construit des profils d'intensité de fluorescence entre la surface et le centre des agrégats. Le logiciel image J est utilisé pour séparer les trois canaux de couleurs (ce qui permet de séparer les trois fluorescences), et obtenir 20 profils d'intensité de marquage entre la périphérie et le centre. On construit ensuite un profil moyen à l'aide du logiciel Excel. Ce protocole est détaillé en figure 45.

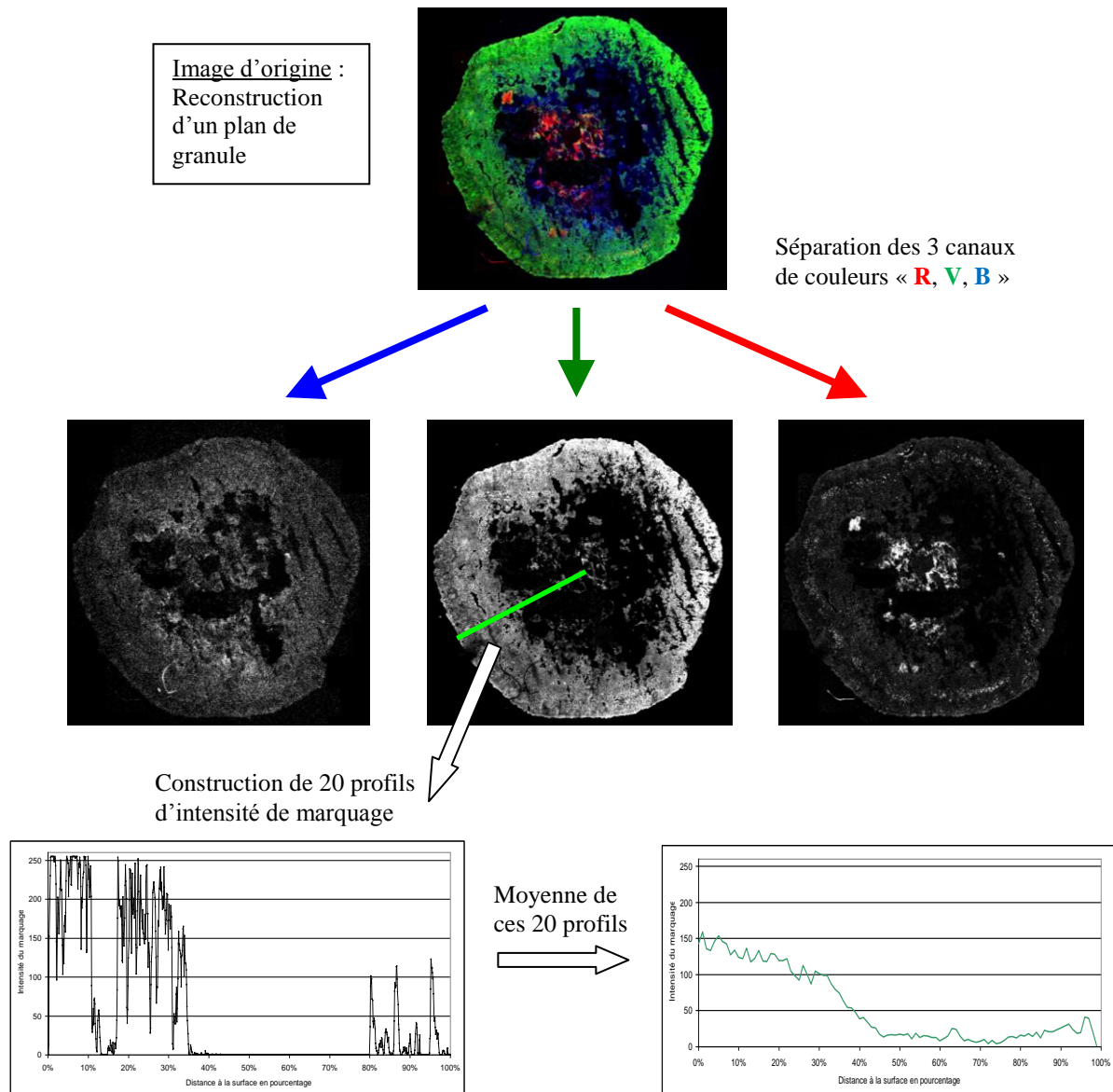


Figure 45 : *Protocole d'obtention de profils d'intensité de marquage des coupes transversales de granules vues au microscope confocal.*

III. Traitements enzymatiques et chimiques des granules

Les granules sont tout d'abord tamisés à 2,82 mm afin de les calibrer et d'éliminer la part floculante des boues des réacteurs. Ils sont ensuite mis en incubation dans différentes conditions pour une période de 24 h à 35 ° C, sous agitation rotative.

Les conditions d'incubation se répartissent en deux catégories. Les traitements enzymatiques qui consistent en des digestions de polymères et ciblent donc les liaisons intrachaines des EPS et les traitements chimiques qui déstabilisent spécifiquement des interactions intermoléculaires.

III.1. Digestions enzymatiques

Les digestions enzymatiques utilisées sont listées dans la table 5. Elles sont effectuées à chaque fois pour des durées de 24 h à 35 °C sous agitation modérée.

Table 5 : Liste des enzymes utilisée pour les traitements des granules.

Substrat digéré	Nom de l'enzyme	Espèce / Provenance	Nomenclature EC	Mécanisme d'action	Tampon utilisé	Concentration (U.mL ⁻¹)	MW (Da)	Fournisseur
α (1-4) glucanes	α-amylase	<i>Aspergillus oryzae</i>	EC=3.2.1.1.	action endogène	PBS 1X, pH 7,5	500 U.mL ⁻¹	54810	Sigma-Aldrich
α (1-4) glucanes	β-amylase	orge	EC=3.2.1.2.	action exogène	acétate, pH 5	500 U.mL ⁻¹	59665	Sigma-Aldrich
α (1-6) glucanes	dextranase	<i>Chaetomium erraticum</i>	EC=3.2.1.11.	action endogène	acétate, pH 5	50 U.mL ⁻¹	36559	Sigma-Aldrich
β (1-4) glucanes	cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	EC=3.2.1.4.	action endogène	acétate, pH 5	50 U.mL ⁻¹	26000	Sigma-Aldrich
liaisons β (1-4) *	lysozyme	Blanc d'œuf de poule	EC=3.2.1.17.	action endogène	PBS 1X, pH 7,5	500 U.mL ⁻¹	23238	Sigma-Aldrich
acides uroniques liés en β (1-4)	Alginate lyase	<i>Flavobacterium sp.</i>	EC=4.2.99.4.	action endogène	PBS 1X, pH 7,5	50 U.mL ⁻¹	38000	Sigma-Aldrich
Protéines	Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	EC=3.4.21.62.	action endogène	PBS 1X, pH 7,5	500 U.mL ⁻¹	27000	Sigma-Aldrich

* liaisons β (1-4) entre résidus d'acide N-acetylmuramic et N-acetyl-D-glucosamine

Les effets des digestions enzymatiques réalisées à pH 7,5 sont évaluées par comparaison avec des incubations similaires dans du tampon PBS seul, sans ajout d'enzymes. Les effets des digestions enzymatiques fonctionnant à pH 5 sont évaluées par comparaison avec des incubations similaires dans du tampon acétate, pH 5 sans ajout d'enzyme.

III.2. Traitements chimiques

Les traitements chimiques qui ont été envisagés au cours de cette étude sont :

- incubation en présence d'EDTA 1% (35 mM), solubilisé dans du tampon Tris 50 mM, pH 8
- incubation en présence de NaCl 500 mM dans du tampon PBS pH 7,5

L'EDTA est un chélateur de cations déstabilisant les pontages de molécules anioniques avec des cations divalents.

La concentration en NaCl choisie correspond à 3 fois la concentration isotonique, ceci afin de déstabiliser les liaisons ioniques par phénomène de compétition.

Les effets des traitements chimiques sont évaluées par comparaison avec des incubations similaires dans du tampon PBS pH 7,5.

III.3. Caractérisation des transferts de matières

III.3.1. Protocole de fractionnement

Les boues granulaires traitées sont ensuite tamisées à 315 μm sous faible courant d'eau de manière à ne pas altérer les agrégats. Le tamisât constitue la phase « solution et microparticules après traitement » (SoMiT) et sera utilisé pour des mesures ultérieures. Le rétentât, contient la phase « macroparticulaire après traitement » (MaT) et la phase « granulaire après traitement » (GrT). Il sera utilisé pour des mesures de résistance aux contraintes hydrodynamiques. Ce protocole de fractionnement est résumé dans la figure 46.

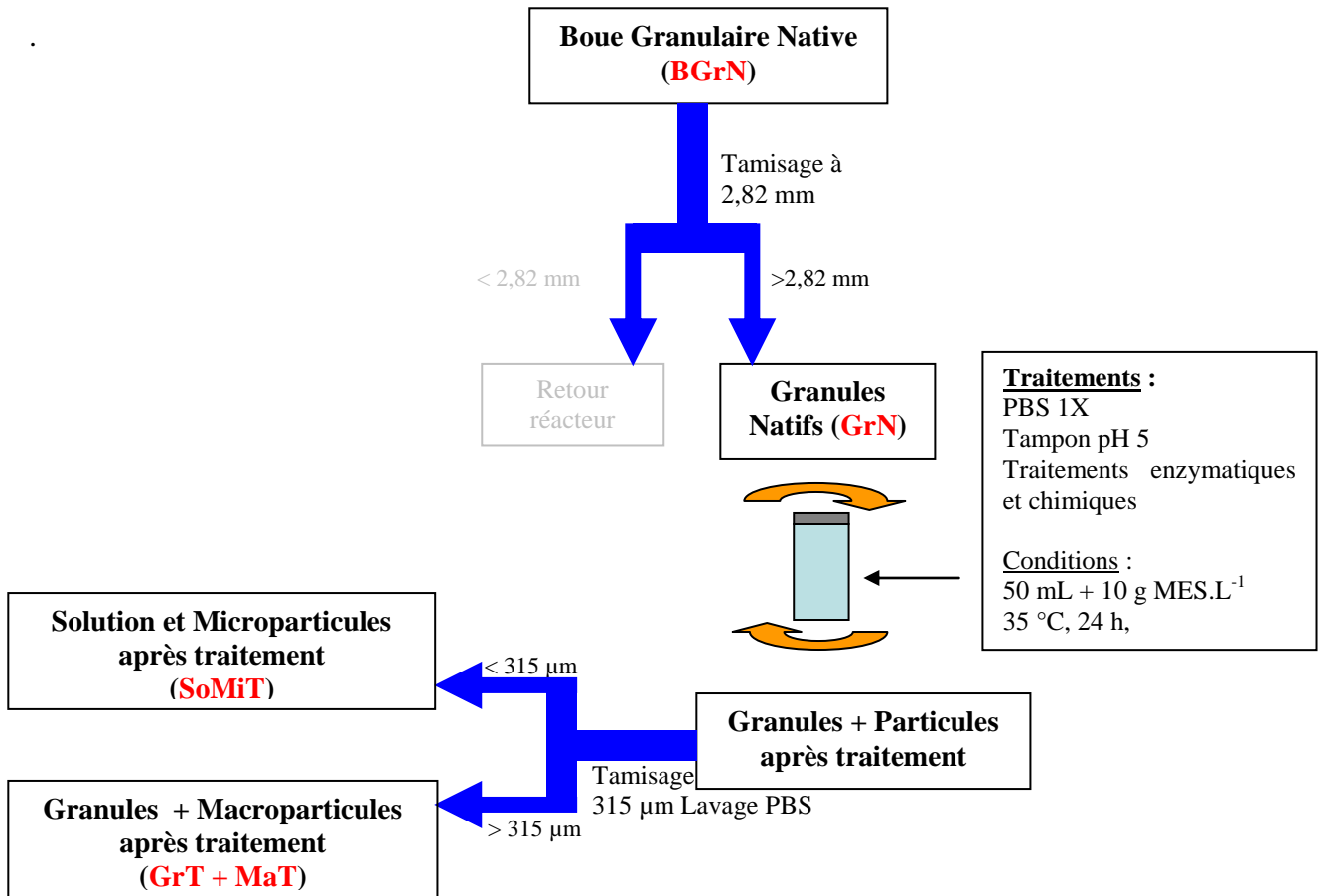


Figure 46 : Protocole de fractionnement après traitements enzymatiques ou chimiques.

III.3.2. Transfert de matière organique

Le transfert de matière organique est évalué par mesure de la turbidité des échantillons avant et après les traitements enzymatiques ou chimiques. La mesure de la turbidité des échantillons liquides contenant des microparticules solides est effectuée par l'absorbance à 640 nm. Pour cela, les échantillons contenant au minimum 10 mL de liquide sont laissés décantés 10 min à température ambiante, puis, 2 mL de la phase supérieure sont prélevés et l'absorbance à 640 nm est mesurée. Le zéro de cette mesure est effectué d'après l'absorbance du PBS 1X pH 7,5.

III.3.3. Libération de calcium

Un spectromètre d'absorption atomique PU 9100 X (PHILIPS) est utilisé pour la mesure. La flamme nécessaire à la mesure est générée à l'aide d'un mélange air/acétylène. La longueur d'onde de la lampe à cathode creuse pour le dosage du calcium est 422,7 nm. Le dosage est effectué par comparaison avec une gamme étalon de calcium entre 0,1 et 5 mg.L⁻¹ dans la même solution de HCl 1 M et Oxyde de Lanthane (LaO) 24 g.L⁻¹.

Les mesures de concentrations en calcium sont effectuées sur un volume connu des échantillons déposé dans des coupelles en aluminium, calcinées 2 h à 500 °C et repris dans un mélange HCl 1 M et Oxyde de Lanthane (LaO) 24 g.L⁻¹. La reprise des échantillons dans ce mélange est effectuée sur un période de 24 h afin de s'assurer que l'intégralité du calcium des cendres générées soit bien solubilisé.

On définit le taux de libération de calcium comme la proportion de calcium transféré dans la phase MiT au cours des digestions enzymatiques et des traitements chimiques (Ca_{MiT}) rapporté à la quantité totale de calcium contenue initialement dans les granules Ca_{total} que nous avons également mesurée.

$$T_{Ca\ MIT} = Ca_{MiT} / Ca_{total}$$

IV. Mesure de la résistance des granules aux contraintes hydrodynamiques

IV.1. Application des contraintes hydrodynamiques

Afin d'évaluer leur résistance, des agrégats sont soumis à des contraintes hydrodynamiques générées dans une cuve en verre de 110 mL par une hélice à pale plate de 2,5 cm de diamètre pouvant tourner à des vitesses entre 200 et 1000 rpm (figure 47). Ceci permet de générer dans la cuve des contraintes de cisaillement qui vont plus ou moins éroder la surface des agrégats, en fonction de leur résistance. Ce test peut être réalisé sur des granules natifs tamisés à 2,82 mm et repris dans le PBS 1X, ou sur la phase MaT + GrT des agrégats ayant subit un traitement enzymatique ou chimique comme détaillé dans le paragraphe III. Suite à ce test, le contenu de la cuve est récupéré pour analyse.

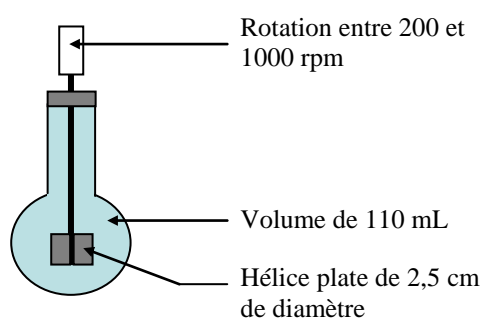


Figure 47 : Schéma d'une cuve agitée.

IV.2. Caractérisation des phénomènes de détachement

IV.2.1. Protocole de Fractionnement

Après application des contraintes hydrodynamiques, les granules traités ou non sont récupérés puis fractionnés par taille de particules. Ces séparations s'effectuent à l'aide de deux tamis (à 315 μ et 2,82 mm) et d'une filtration à 1,5 μ m. Le protocole complet, lorsqu'il est réalisé à la suite d'un traitement enzymatique ou chimique est récapitulé dans la figure 48.

Les deux tamisages successifs et la filtration permettent de séparer les particules issues de ce traitement en quatre phases : La phase Granules après contraintes hydrodynamiques (GrTHy), la phase Macroparticules après contraintes hydrodynamiques (MaTHy), la phase Microparticules après contraintes hydrodynamiques (MiTHy) et la phase soluble après contraintes hydrodynamiques (SoTHy).

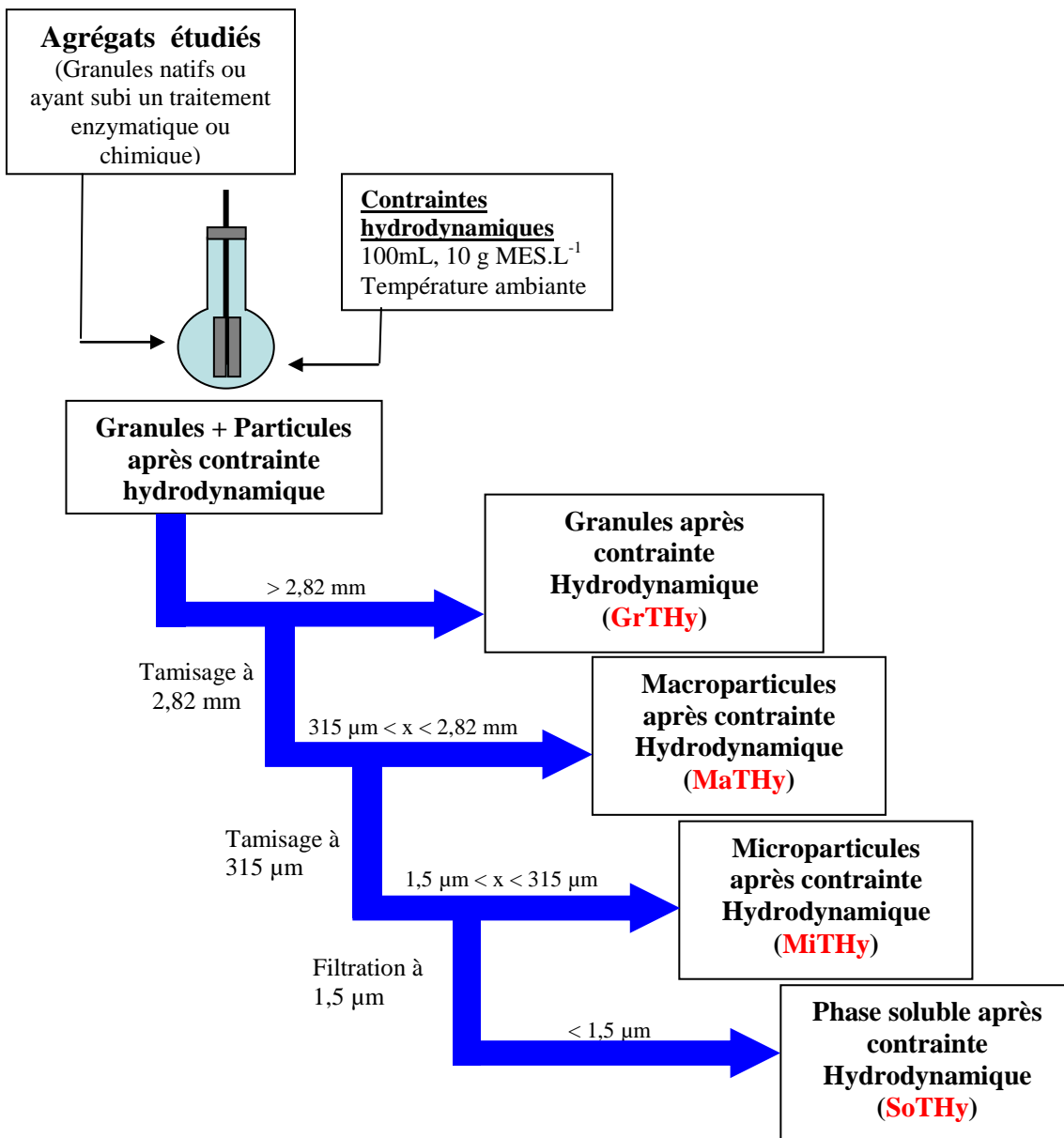


Figure 48 : Protocole de fractionnement des granules pour la mesure de leur résistance aux contraintes hydrodynamiques.

IV.2.2. Paramètres du détachement

Afin de mesurer les intensités de détachement, et ainsi caractériser la résistance des granules, on définit un taux de transfert de matière organique volatile T_{MOV} . Ce taux de transferts, calculé pour chacune des phases séparées durant les tests de contraintes hydrodynamiques, correspond à la masse de MV contenue dans la phase (m_{MV} « phase »), rapportée à la masse de MV totale des granules calculée à partir de la somme des masses de MV de chacune des phases :

$$T_{MOV} \text{ GrTHy} = m_{MV} \text{ GrTHy} / (m_{MV} \text{ MiT} + m_{MV} \text{ GrTHy} + m_{MV} \text{ MaTHy} + m_{MV} \text{ MiTHy} + m_{MV} \text{ SoTHy})$$

$$T_{MOV} \text{ MaTHy} = m_{MV} \text{ MaTHy} / (m_{MV} \text{ MiT} + m_{MV} \text{ GrTHy} + m_{MV} \text{ MaTHy} + m_{MV} \text{ MiTHy} + m_{MV} \text{ SoTHy})$$

$$T_{MOV} \text{ MiTHy} = m_{MV} \text{ MiTHy} / (m_{MV} \text{ MiT} + m_{MV} \text{ GrTHy} + m_{MV} \text{ MaTHy} + m_{MV} \text{ MiTHy} + m_{MV} \text{ SoTHy})$$

$$T_{MOV} \text{ SoTHy} = m_{MV} \text{ SoTHy} / (m_{MV} \text{ MiT} + m_{MV} \text{ GrTHy} + m_{MV} \text{ MaTHy} + m_{MV} \text{ MiTHy} + m_{MV} \text{ SoTHy})$$

De la même façon qu'au paragraphe III, on calcule également un taux de transfert de matière organique mesurée par la turbidité du mélange des phases microparticulaire et solubles : $T_{Tu\ 640} (\text{MiTHy} + \text{SoTHy})$, et un taux de libération de calcium dans les phases microparticulaires et solubles : $T_{Ca} (\text{MiTHy} + \text{SoTHy})$.

V. Caractérisation des Substances Polymériques Extracellulaires (EPS)

V.1. Extraction des EPS

Les échantillons de boue granulaire sont concentrés par centrifugation et dilués dans un tampon PBS afin d'obtenir une concentration en MVS comprise entre 5 et 20 g MVS.L⁻¹.

L'extraction des EPS est effectuée en trois étapes successives. Une étape d'extraction mécanique réalisée par un traitement aux ultrasons ou par des billes de verre et deux étapes d'extraction chimiques effectuées par incubation d'une heure dans un tampon PBS Tween 0,25 % pour la première et dans un tampon Tris pH 8 additionné de 2 % d'EDTA pour la seconde (figure 49).

Afin de s'assurer de l'épuisement le plus complet possible du contenu en EPS des granules utilisés, on peut ensuite réaliser plusieurs itérations de ce même protocole.

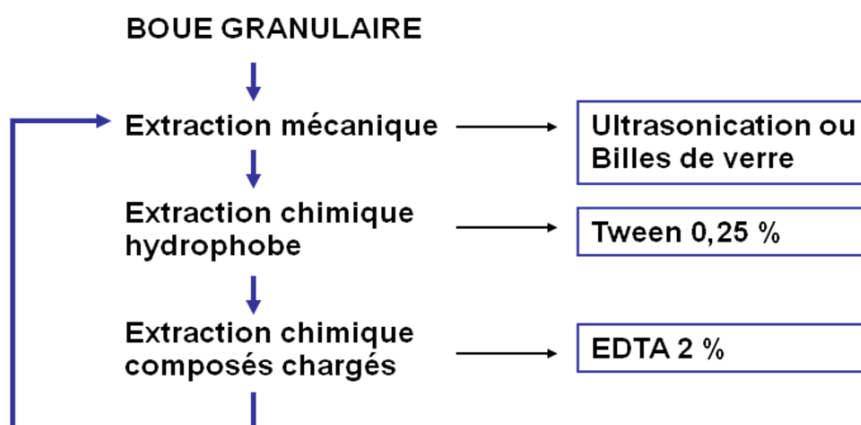


Figure 49 : protocole d'extraction des EPS des granules en trois étapes.

Avant ces étapes, le tampon PBS est utilisé pour un lavage des échantillons de boue granulaire afin d'éliminer les composés solubles (centrifugation à 12 000 g pendant 10 min à 4°C (centrifugeuse BECKMAN) puis remise en solution dans le tampon PBS). Le contenu en EPS des solutions éliminées durant ces étapes est également mesuré, cependant, les valeurs trouvées sont toujours négligeables en comparaison des quantités extraites lors de la suite du protocole.

L'échantillon est également centrifugé après chaque application d'une méthode d'extraction, afin de récupérer le surnageant contenant les EPS extraites par la méthode correspondante. La centrifugation est aussi effectuée à 12 000 g pendant 10 min à 4°C.

V.1.1. Extraction mécanique

V.1.1.1. Extraction par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes sonores dont la fréquence est supérieure au seuil d'audition humaine (20 kHz). Leur propagation dans un milieu tel que les boues activées ou les granules va entraîner une succession de compression et de décompression qui à partir d'une certaine intensité peuvent provoquer la formation de bulles qui vont immédiatement imploser en induisant de très importantes contraintes de cisaillement (Dewil et al., 2006).

Concernant la puissance à appliquer, il est suggéré de ne jamais dépasser la valeur de 70 000 kJ par kg de MVS pour éviter les lyses cellulaires (Prorot et al., 2008). Quant à la fréquence, selon la thèse de Julien LAURENT (ENSIL Limoges, 2009), la déstructuration de boues floculantes est la plus efficace pour des fréquences basses (comprises entre 20 et 40 kHz). Pour cette raison, nous décidons d'utiliser ce paramètre dans le cas des boues granulaires.

Des extractions par ultrasons sont effectuées à l'aide d'une sonde à ultrasons HD 2200 (Bandelin Electronic) délivrant une puissance de 120 Watts. Au cours de ce traitement, l'échantillon est maintenu à 4°C dans un bain de glace. Afin de limiter encore plus l'échauffement des échantillons, le traitement par ultrasons est interrompu toutes les 30 s et les boues granulaires sont laissées au repos dans la glace pour une durée de 30 s avant de reprendre le traitement par ultrasons.

V.1.1.2. Extraction par les billes de verre

Des billes de verres de 1 mm de diamètre sont également utilisées pour l'étape d'extraction mécanique.

Les boues granulaires lavées et reprises en PBS à une concentration d'environ 20 g MVS.L⁻¹ sont ajoutées aux billes à raison d'un volume de boue pour un volume de billes (1v/1v). Le mélange est ensuite agité à l'aide d'un vortex pour des durées variables divisées en section de 30 s d'agitation continue.

Afin de limiter les échauffements, les tubes sont placés dans la glace entre chaque session pour une durée de 30 s avant de reprendre l'agitation.

Les billes sont ensuite séparées des granules par un filtre aux pores de 0,9 mm de diamètre et sont rincées par du PBS.

V.1.2. Extractions chimiques

Le détergent non-ionique Tween 0,25 % (ACROS Organics) est préparé dans le tampon PBS. Les propriétés de tensio-actif de ce tampon permettent de rompre les liaisons hydrophobes au sein du granule.

L'agent chélatant acide éthylène diamine tétra acétique 2 % (EDTA, ACROS organics) n'étant soluble qu'à des pH supérieurs à 8, il est mis en solution dans du tampon Tris-HCl 0,3 mol.L⁻¹ pH 8. Ce tampon est utilisé pour rompre les liaisons ioniques des agrégats.

Après centrifugation et récupération des extraits (surnageant) de l'étape précédente, les granules sont remis en solution dans le tampon correspondant et placé sous agitation dans un agitateur rotatif type « soleil » (Agitest 34050, Bioblock Scientific) pour une durée de 1 h.

Deux étapes d'extractions chimiques sont réalisées successivement, la première utilisant le tampon tween et la seconde le tampon EDTA.

V.2. Quantification des EPS

V.2.1. Dosage des protéines par la méthode à l'acide bicinchonique (BCA)

Selon Smith et al. (1985), la quantification des protéines par la méthode BCA implique la formation d'un complexe BCA-Cu²⁺ de couleur pourpre dont l'intensité est mesurée à 562 nm.

Le réactif BCA est un kit commercialisé par SIGMA (BCA-Kit), constitué de deux solutions :

- un composant A contenant de l'acide bicinchonique, du carbonate de sodium, du bicarbonate de sodium, du tartrate de sodium et du sulfate cuprique pentahydraté ;
- un composant B contenant du sulfate de cuivre à 1%.

La solution de travail BCA se prépare en mélangeant les composants A et B dans des proportions 50/1 (v/v). Dans le cas du micro-dosage, 25 µL d'échantillon sont incubés avec 200 µL de solution de travail BCA dans des micro-plaques de 96 puits. Dans le cas du macro-dosage, utilisé pour des échantillons fortement chargés en EDTA, 25 µL d'échantillon sont incubés avec 1 mL de solution de travail BCA. L'incubation est effectuée pendant 15 minutes à 60 °C, la plaque est ensuite refroidie à température ambiante avant la lecture à 562 nm en lecteur à microplaque (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH) pour la microméthode ou par spectrophotométrie (UV SPECTRONIK 1201) en micro-cuve pour la macrométhode.

Une gamme étalon en Bovine Serum Albumine (BSA, SIGMA) à des concentrations comprises entre 0 et 1 g.L⁻¹ est traitée en parallèle de manière identique.

V.2.2. Dosage des polysaccharides par la méthode à l'Anthrone

Selon Dreywood (1946), le dosage à l'Anthrone permet de mesurer les sucres totaux réducteurs qui possèdent des fonctions carbonyles ($C = O$). La réaction entre l'anthrone et les sucres est visualisée par une couleur verte dont l'intensité est mesurée à 620 nm.

Le réactif à l'Anthrone (SIGMA) est préparé à raison de 2 g.L^{-1} dans de l'acide sulfurique concentré (ACROS organics). $100 \mu\text{L}$ d'échantillon sont mis en contact avec $200 \mu\text{L}$ de réactif Anthrone dans chaque puits d'une plaque 96 puits. Les plaques sont laissées à incuber 30 min à 70°C puis refroidies à 4°C jusqu'à la température ambiante. L'absorbance est lue à 620 nm en lecteur de plaque (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH).

Des solutions de D-glucose (SIGMA) à des concentrations comprises entre 0 et $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ sont utilisées comme étalons.

V.2.3. Dosage des acides uroniques par la méthode au MétaHydroxyDiPhénol (MHDP)

V.2.3.1. Principe du Dosage :

Selon van den Hoogen et al (1998), le dosage au MétaHydroxyDiPhénol (MHDP) est spécifique des acides uroniques qui sont des sucres chargés dans lesquels, une fonction acide carboxylique $-\text{COOH}$ remplace l'alcool primaire $-\text{CH}_2\text{OH}$ des oses neutres (fonction située en position 6 dans le cas du glucose qui devient alors acide glucuronique). La réaction entre le MHDP et les sucres chargés est visualisée par une couleur rose dont l'intensité est mesurée à 540 nm.

Deux solutions de réactifs sont préparées pour ce dosage. La première est une solution de tétraborate de sodium 120 mM (SIGMA) dans de l'acide sulfurique 96 % (ACROS organics). La seconde est obtenue par ajout d'un volume de solution de MHDP 100 mg.mL^{-1} dans le dimethyl sulfoxide (DMSO) dans 50 volumes d'acide sulfurique 80 % (ACROS organics).

Lors d'une première étape, $40 \mu\text{L}$ d'échantillons répartis dans une microplaque 96 puits sont mis en présence de $200 \mu\text{L}$ de la première solution, ce qui donne une concentration finale en acide sulfurique de 80 % (v/v) et en tétraborate de sodium de 0,1 M. La plaque est ensuite placée 1 h à 80°C . L'acide sulfurique permet l'hydrolyse des polymères. La présence du tétraborate quant à elle améliore la sensibilité du dosage (van den Hoogen et al (1998)).

La densité optique à 540 nm est ensuite prise à l'aide d'un lecteur de plaque (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH). Cette première absorbance a pour but de mesurer le bruit de fond dû à des colorations aspécifiques (principalement des oses neutres qui se colorent en marron au contact de l'acide sulfurique concentré).

Puis $40 \mu\text{L}$ de la seconde solution sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est laissée 15 min à température ambiante et la densité optique est à nouveau mesurée en lecteur de plaque (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH). L'intensité de la mesure correspondant à chaque échantillon est obtenue en soustrayant le bruit de fond à cette seconde valeur.

Des solutions d'acide D-glucuronique (SIGMA) à des concentrations comprises entre 0 et $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ sont utilisées comme étalons.

V.2.3.2. Validation du dosage

Ce dosage utilisant le MHDP qui est utilisé dans le cadre de cette étude a rarement été utilisé dans des milieux complexes tels que les extraits d'EPS issus de granules aérobies. C'est pourquoi il est important de mesurer les interférences entre ce dosage et les différents composants potentiels des extraits (oses neutres, protéines).

Les signaux respectifs attribués aux différents types d'acides uroniques devront être comparés afin de savoir si ce dosage permet bien la quantification de l'ensemble des acides uroniques de façon équivalente.

V.2.3.2.1. Interférences avec les protéines

Il est possible que la présence de protéines en concentration importante soit à l'origine de perturbation de la mesure. En particulier si celles-ci sont glycosylées. L'influence de concentrations croissantes en protéines a donc été mesurée via l'ajout de différentes protéines aux solutions standards d'acide glucuronique. Le test est effectué avec des protéines glycosylées (Albumine de Sérum de Bœuf (BSA) et α -amylase) et non glycosylées (trypsine) pour des concentrations de 0,05 ; 0,125 ; 0,25 et 0,5 g.L⁻¹.

Les résultats obtenus montrent que ces concentrations en protéines mélangées à la gamme d'acide glucuronique ne modifient pas le signal obtenu pour le dosage de l'acide glucuronique. Cela signifie que les protéines présentes dans les extraits d'EPS ne devraient pas gêner le dosage des acides uroniques.

V.2.3.2.2. Effets de variations des proportions de réactif du dosage

Des gammes étalons d'acide glucuronique ont été dosées en faisant varier les quantités de solution de travail (solution de tétraborate de sodium dans l'acide sulfurique concentré) et de solution de réactif MHDP (figure 50). L'objectif est de tenter d'augmenter la sensibilité de ce test dont les résultats varient d'un échantillon à l'autre pour des concentrations égales en acide glucuronique.

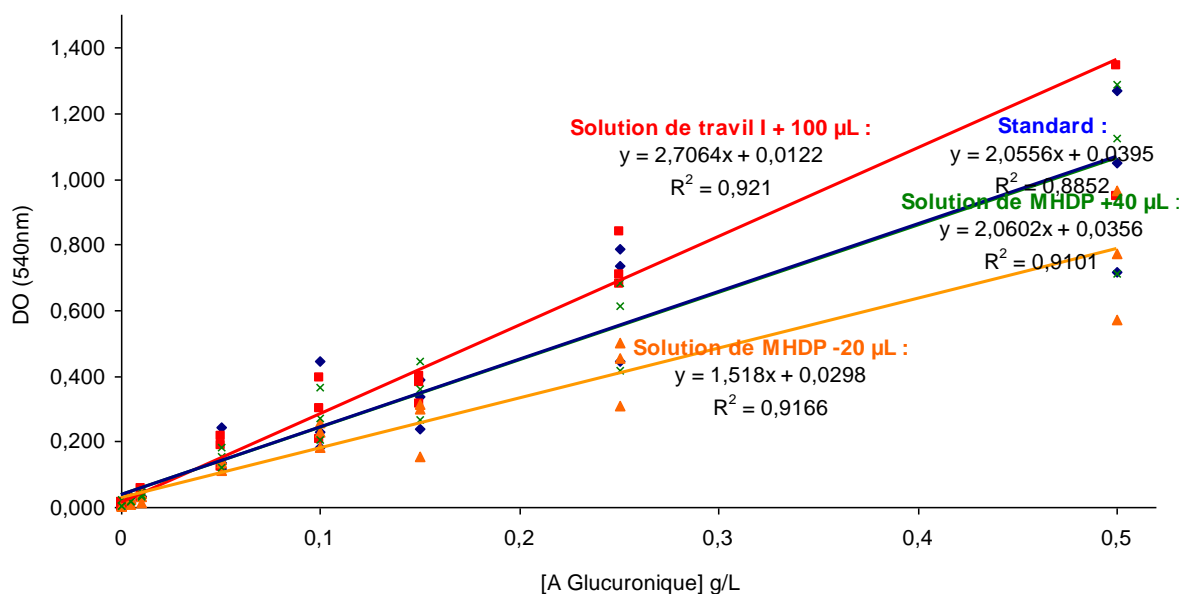


Figure 50 : dosage de gammes d'acide glucuronique en utilisant différentes proportions de la solution de travail 1 (tétraborate de sodium 120 mM dans de l'acide sulfurique à 96 %) et de solution de MHDP (MHDP 2 mg.mL⁻¹, DMSO 2 % (V/V), acide sulfurique 78,4 %).

Ces variations dans la composition des réactifs de dosage n'engendrent pas de différences sur l'intensité du signal ni sur sa précision. Il est donc inutile de modifier le protocole de dosage. En outre, d'après van den Hoogen et al, (1998), les proportions de réactifs utilisés ont été choisies car elles permettaient de maintenir constante la concentration en acide sulfurique au cours de l'expérience et donc de ne pas provoquer de variations dans le phénomène de brunissement dû aux oses neutres.

Si le dosage des acides uroniques par la méthode au MHDP semble efficace, il n'est pas à ce stade complètement validé. Il sera notamment nécessaire de réaliser ce test sur des gammes de solution d'alginate de composition complètement maîtrisée, ainsi que sur différents autres types d'acides uroniques. Néanmoins, ce dosage sera utilisé dans la détermination de la nature des EPS extraits des granules.

V.3. Quantification de la G6P-DH

V.3.1. Principe du dosage

La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-PDH) est une enzyme intracellulaire de la voie des pentoses-phosphate catalysant l'oxydation du D-glucose-6-phosphate en D-glucose-6-phosphate déshydrogéné, réaction associée à la réduction du NAD en NADH (Figure 52).

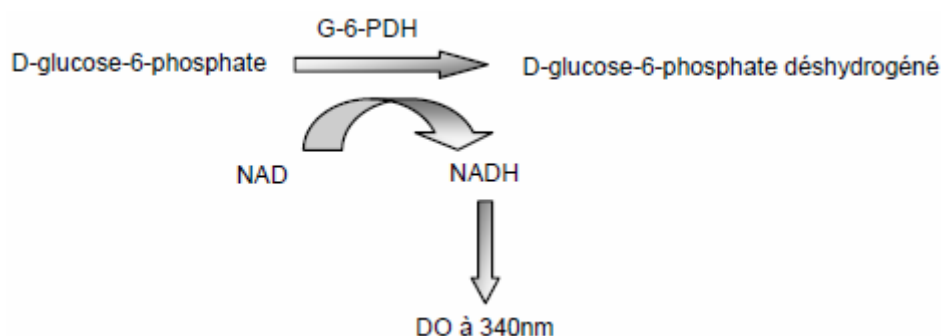


Figure 51 : Catalyse de l'hydrolyse du D-glucose-6-phosphate par la G6P-DH.

Le dosage de l'activité de la G6P-DH s'effectue par la mesure de l'apparition du NADH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6223 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) qui peut être suivie par lecture de l'absorbance à 340 nm, en fonction du temps (Lessie et Vander Wyk, 1972).

V.3.2. G6P-DH des extraits

Une solution de substrat contenant du D-glucose-6-phosphate ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), du 2-mercapto-éthanol ($10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$), du NAD ($5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) solubilisés dans du tampon Tris ($2 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$) est préparée et le pH est ensuite ajusté à 8,5 avec de l'acide chlorydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Pour mesurer l'activité G6P-DH contenue dans les différents extraits d'EPS, 800 μL de substrat sont ajoutés à 200 μL d'échantillon directement dans une plaque 96 puits. La mesure de l'absorbance à 340 nm est suivie au cours du temps par un lecteur de plaque (FLUOstar OPTIMA BMG LABTECH). Cette mesure s'effectue à 40 °C.

Lorsque la courbe d'apparition de la DO_{340nm} est croissante, l'activité G6P-DH correspond à la vitesse initiale d'apparition du NADH et donc d'oxydation du G-6-P et est exprimée en nmoles de NADH apparues par min.

Lors des mesures d'activité G6P-DH effectuées sur les solutions d'EPS extraites, il est possible que les tampons extractants utilisés inhibent les enzymes. C'est pourquoi des tests d'activité de l'enzyme ont été effectués dans des tampons PBS tween 0,25 % et tris EDTA 2 %, montrant ainsi que la G6P-DH est tout à fait fonctionnelle dans nos conditions expérimentales.

V.3.3. G6P-DH des granules

La difficulté dans ce cas est que la présence de particules non dissoutes dans le solvant va empêcher la mesure de l'absorbance. Pour commencer, on centrifuge les granules à 1000 g à l'aide d'une centrifugeuse J2-21 M/E (Beckman) puis on élimine une partie du surnageant de manière à retirer 30 % du volume de liquide. On prélève 1,5 mL de ce mélange auquel on ajoute 0,5 mL de substrat concentré 4 fois et on les place à 40 °C dans un bain à sec.

A $t = 0, 4, 8$ et 12 min, on retire le tube du bain à sec, on centrifuge à 14 500 rpm à l'aide d'une centrifugeuse de paillasse Minispin plus (ependorf) on prélève 120 μL de surnageant. Les enzymes (G6P-DH) sont inactivées par 5 min d'incubation à 80 °C en bain à sec puis placées dans la glace (4 °C). Les boues sont ensuite remises en solution dans le tube et remises à incuber à 40 °C.

L'absorbance à 340 nm des surnageants inactivés est mesurée à l'aide d'un lecteur à microplaques FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH). Lorsque la courbe d'apparition de la DO340nm est croissante, l'activité G6P-DH correspond à la vitesse initiale d'apparition du NADH et donc d'oxydation du G-6-P et est exprimée en nmoles de NADH apparues par min.

V.4. Techniques chromatographiques

V.4.1. Appareillage

L'appareil à chromatographie liquide utilisé est un système AKTA Purifier (GE Healthcare) classiquement utilisé à des basses et moyennes pressions. Le système comporte une pompe par éluant utilisé, avec possibilité de générer un gradient continu ou discontinu entre deux éluants (A et B), une boucle d'injection, un conductimètre, un détecteur UV et un collecteur de fractions.

Avant toute analyse, les solutions utilisées pour l'adsorption ou l'élution des composés sont filtrées sur 0,2 μm et dégazées par ultrasonication.

Les profils chromatographiques sont enregistrés en temps réel par un logiciel intégré à l'appareil chromatographique (UNICORN 5.1, GE Healthcare). Les temps de rétention ou volumes d'élution sont directement calculés et fournis par le logiciel. L'intégration de la surface des pics d'un profil est calculée automatiquement mais la ligne de base du profil doit parfois être ajustée manuellement par rapport à la tendance du profil.

V.4.2. Chromatographie de gel filtration

Colonne protein KW 804 :

Cette séparation est réalisée sur une colonne de type ProtK804 (Shodex). Son volume de phase mobile est 7 ml. Elle va permettre une séparation selon la taille de molécules dans un domaine allant de 4000 à 5.10^6 Da. Le tampon circulant est le PBS à un débit de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

L'équilibration de la colonne est effectuée avec du PBS en imposant un débit croissant entre 0,01 et $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ puis décroissant entre 1 et $0,01 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

La mesure des tailles de molécules séparées par cette méthode est effectuée par comparaison avec une courbe étalon réalisée grâce aux mesures effectuées par le constructeur (Shodex) complétées ultérieurement par d'autres mesures de protéines (figure 52).

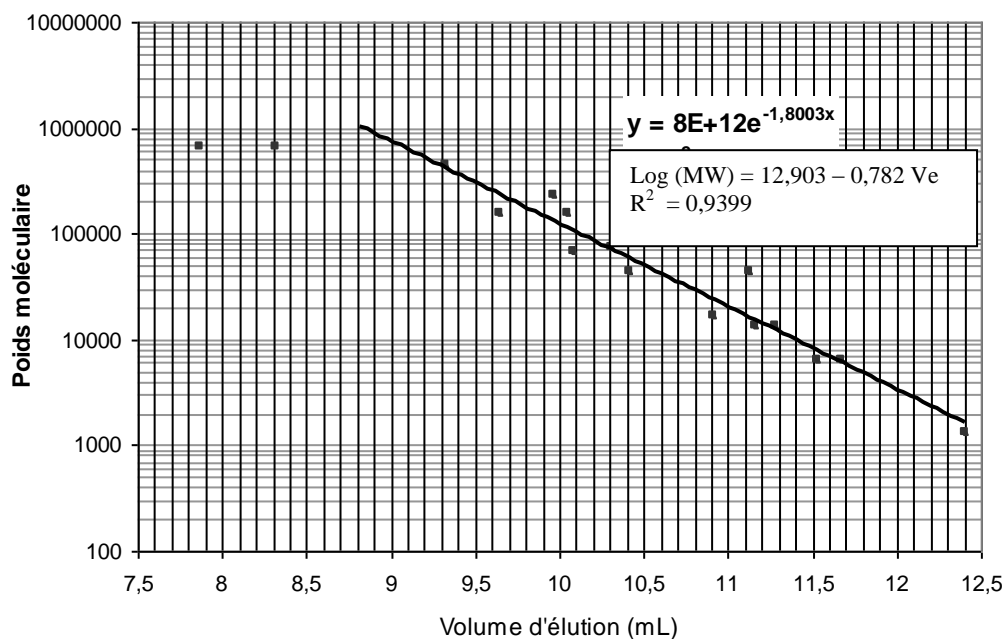


Figure 52 : Courbe étalon utilisée pour la mesure des poids moléculaires des protéines séparées par une colonne de type ProtK804.

Les protéines utilisées pour l'établissement de cette courbe étalon, ainsi que les valeurs de volumes d'élution obtenues sont répertoriées dans la table 6. L'équation affichée sur cette courbe est utilisée pour effectuer les mesures de tailles pour des protéines allant de 1000 à 500 000 Da.

Table 6 : Protéines utilisées pour l'étalonnage de la colonne de type ProtK804

	Molécule	Poids moléculaire (Da)	Volume d'élution (mL)
Mesures constructeur (Shodex)	Vitamin B12	1350	12,40
	Aprotinin	6500	11,67
	Ribonuclease A	13700	11,16
	Myoglobin	17000	10,91
	Ovalbumin	43000	10,41
	BSA	67000	10,08
	Aldolase	158000	9,64
	thyroglobuline	669000	7,87
	Aprotinin	6500	11,53
	Ribonuclease A	13700	11,28
Mesures complémentaires	ovalbumine	43000	11,12
	conalbumine	75000	10,31
	aldolase	158000	10,05
	catalase	232000	9,96
	Ferritin	440000	9,32
	thyroglobuline	669000	8,32

Afin de valider la répétabilité de ces mesures, certaines protéines de tailles connues ont été injectées dans une colonne de type ProtK804 suivant cette méthode. Les résultats des mesures sont répertoriés dans la table 7.

Table 7 : Test de reproductibilité de la mesure de tailles de protéine effectuée par passage dans une colonne de type ProtK804.

Etalon protéiques			
Protéine	V1 (ml)	V2 (ml)	Poids moléculaire (Da)
Thyrogobuline	8,22	8,25	669 000
Contaminant 1	7,35	7,38	
Contaminant 2	10,25	10,28	
Ferritine	9,31	9,32	440 000
Contaminant 1	8,42	8,46	
Contaminant 2	5,96	5,93	
Aldolase	10,05	10,08	232 000
Aprotinine	11,53	11,58	6500

Selon ces mesures il est envisageable d'avoir un écart de volume d'éluion allant jusqu'à 0,05 mL.

colonne Superdex 75 :

Une colonne Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) est également utilisée pour des effectuer des séparations complémentaires. Cette colonne sépare les molécules de 1 000 à 150 000 Da ce qui permet une meilleure résolution dans le domaine des petites tailles. La phase stationnaire est composée d'agarose et de dextrans. Du tampon PBS a été utilisé comme tampon circulant à 0,5 mL.min⁻¹.

La mesure des tailles de molécules séparées par cette méthode est effectuée par comparaison avec une courbe étalon réalisée grâce aux mesures effectuées par le constructeur sur des protéines de tailles connues (GE Healthcare, Table 8, figure 53).

Table 8 : Mesure de tailles des volumes d'éluion de protéines de tailles connues lors du passage dans une colonne Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare).

Etalon protéiques		
Protéine	Volumes d'éluion (mL)	Poids moléculaire (Da)
Aldolase	8,6	158000
Conalbumine	9,47	75000
Ovalbumine	10,35	43000
Ribonucléase	13,37	13700
Aprotinine	15,56	6500
Vitamine B12	18,9	1355

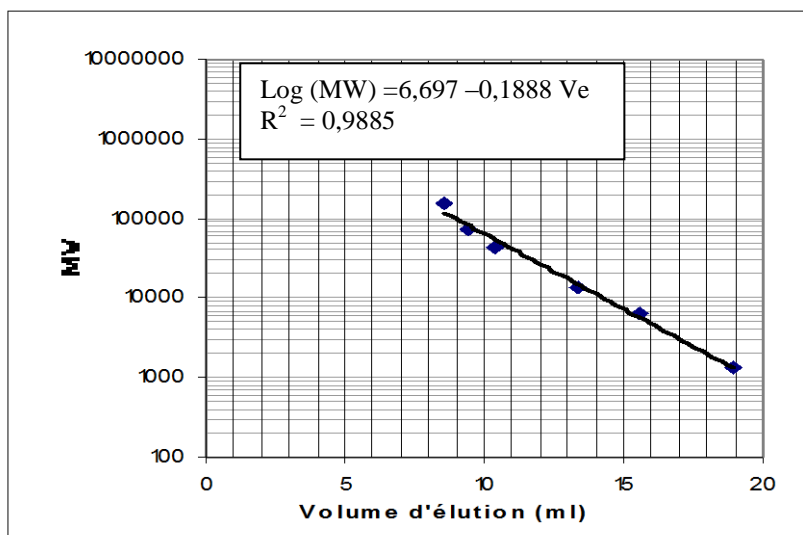


Figure 53 : courbe étalon de la colonne Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare)

V.4.3. Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions

La séparation de composés par chromatographie échangeuse d'anions est basée sur la rétention des molécules anioniques par des groupements chargés positivement greffés sur une phase stationnaire inerte.

La colonne utilisée pour le fractionnement des EPS en fonction de leur charge négative est une colonne de 1,6 mL contenant des particules de Polystyrène / divinylbenzène de 15 µm sur lesquelles sont greffées des amines quaternaires porteuses de charges positives fortes (Source 15 Q, GE Healthcare).

La colonne est équilibrée en tampon Tris HCL 20 mM pH 8,5 (tampon A) à un débit de 1 mL.min⁻¹.

Afin d'éviter les perturbations liées aux tampons utilisés, les échantillons (volume compris entre 10 et 25 mL) sont dialysés à 4 °C pour une période de 12 h minimum contre du tampon A (5 L) en utilisant des membranes de dialyse molecularporous membrane (SPECTRA/POR).

Des volumes de 1 à 5 mL de ces échantillons dialysés sont injectés. L'éluion est réalisée par ajout graduel de tampon Tris à pH 8 NaCl 1 M (tampon B) afin de générer un gradient de concentration en NaCl allant de 0 à 1 M pendant 14 min.

Chapitre 3 : Propriétés générales des boues granulaires étudiées

I. Activité microbienne des boues granulaires

Les granules de notre étude ont été cultivés dans deux réacteurs identiques de type « batch séquencé » (SBR) avec des conditions de culture imposées qui diffèrent par la composition de l'effluent d'alimentation (table 1, Chapitre 2 : Matériel et Méthodes, paragraphe I.1.). R1 et R2 sont tous les deux caractérisés par un temps de décantation suffisamment long de manière à ne pas provoquer une sélection rapide des agrégats par la densité. Ce choix permet de cette façon d'étudier plus particulièrement les effets de l'alimentation riche en azote utilisée sur les propriétés des granules et notamment sur leurs caractéristiques physiques.

La distinction entre les deux réacteurs provient de la nature de la composition de l'alimentation (table 1, Chapitre 2 : Matériel et Méthodes paragraphe I.1.). En effet, en ajoutant 0,28 kg de nitrates par jour et par m³, dans le réacteur R1, on favorise la croissance des bactéries hétérotrophes en phase anoxie (dénitrification). Ceci a pour effet, dans ce réacteur, de promouvoir la dénitrification, ainsi que la colonisation des granules par les microorganismes anoxie/aérobie facultatifs qui y sont associés. En absence de cet ajout, le réacteur R2, dans lequel sont imposées des alternances anaérobie/aérobie, sert de témoin.

L'intérêt de cette distinction, est d'étudier ses conséquences sur les activités biologiques et épuratrices des agrégats, ainsi que sur leurs propriétés physiques. La figure 54 montre la capacité d'élimination de l'azote sous forme ammoniacale (NH₄⁺) et de la matière organique (mesurée par la DCO) des granules des deux réacteurs.

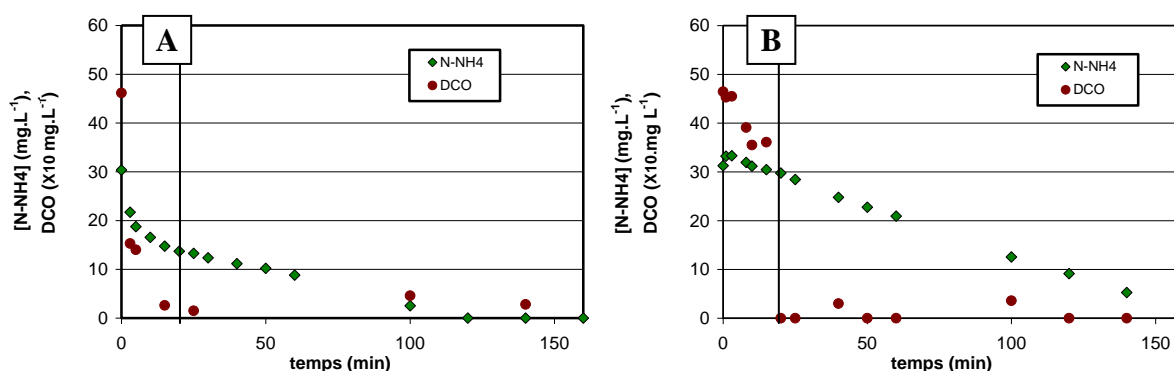


Figure 54 : Épuration de l'azote sous forme ammoniacale (NH₄⁺) et de la matière organique mesurée par la DCO par granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B). La séparation entre les phases anoxie (R1) et anaérobie (R2) et la phase aérobie est signalée par un trait vertical.

On observe une consommation sensiblement plus rapide de la DCO par les granules de R1 durant la phase non aérée par rapport au réacteur R2. En effet la présence de nitrates (accepteur d'électrons) au début du cycle conduit à une élimination presque complète de la DCO en moins de 10 minutes, alors que uniquement 25 % de la DCO est éliminée en phase non aérée du réacteur R2 due à l'absence complète d'accepteur d'électrons (la DCO est ensuite rapidement dégradée après 20 minutes lorsque l'oxygène est apporté).

Comme on le voit, les granules du réacteur R1 offrent une élimination quasiment complète de l'ammonium. En effet, l'activité autotrophe nitrifiante conduit à une vitesse de consommation dans ce réacteur de 15,2 mg_N L⁻¹ h⁻¹, contre 10,7 mg_N L⁻¹ h⁻¹ pour les granules de R2.

II. Propriétés physiques des granules

II.1. Aspect et morphologie des granules

On peut observer sur la figure 55 des photographies des granules des deux réacteurs effectuées sans grossissement. Les images A et B sont prises sur fond noir et avec un éclairage par dessus, alors que sur les images C et D, l'éclairage est effectué par dessous au travers d'une feuille blanche de manière à bien distinguer les contours des parties les plus compactes des agrégats, en particulier dans le cas des granules de R2.

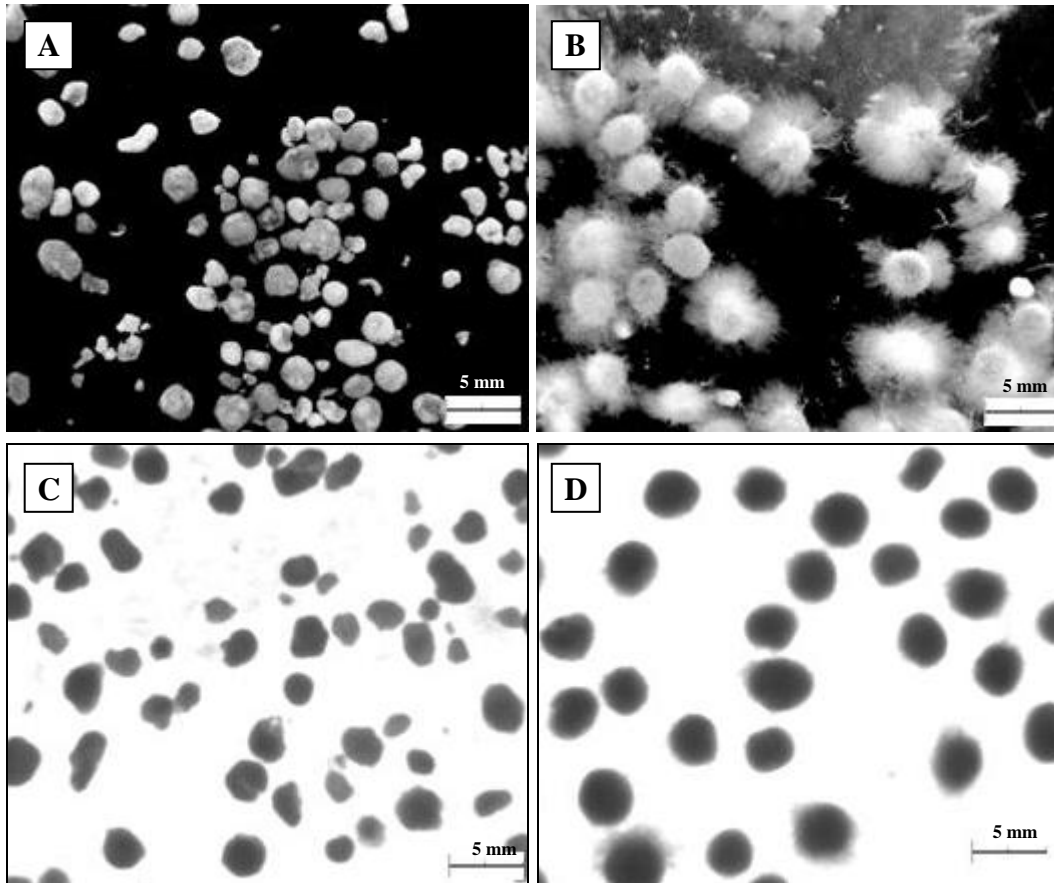


Figure 55 : Photographies des granules natifs des deux réacteurs. A : Réacteur R1 éclairé par au dessus et en fond noir, B : Réacteur R2 éclairé par au dessus et en fond noir, C : Réacteur R1 éclairé par en dessous, D : Réacteur R2 éclairé par en dessous.

Les granules de R1 ont une apparence très compacte, une surface très lisse et des formes irrégulières. Les tailles des agrégats semblent en outre très variables. Les granules de R2 possèdent un « corps » compact recouvert de longs filaments de plusieurs millimètres de long. Ces filaments sont probablement dus à l'implantation de bactéries filamenteuses à la surface des agrégats de ce réacteur. Ils sont de plus dotés d'une forme sphérique très régulière, et leur taille semble beaucoup moins diversifiée que dans le cas de R1.

On peut penser que la croissance de bactéries hétérotrophes filamenteuses dans le réacteur R2 est due à la limitation de l'oxygène et à l'excès de substrat facilement biodégradable présent au début de la phase aérobie. Ceci modifie considérablement les propriétés physiques mais perturbe aussi l'activité des bactéries nitrifiantes qui ne sont pas observées dans les filaments mais uniquement dans les granules (Thèse A. Filali, 2011).

Par ailleurs, comme indiqué par Wan et al., (2009) la croissance des bactéries hétérotrophes anoxiques dans les couches internes encourage la densification des agrégats observée sur les granules de R1. En effet, durant la période d'exploitation, le SVI_{30} des granules est passé de 30 à 16 $mL.g^{-1}$ pour R1 et de 30 à 90 $mL.g^{-1}$ pour R2.

II.2. Mesure des dimensions des granules

A partir de ces images, des mesures de la dispersion des diamètres des granules de R1 et R2 ont été réalisées (figure 56).

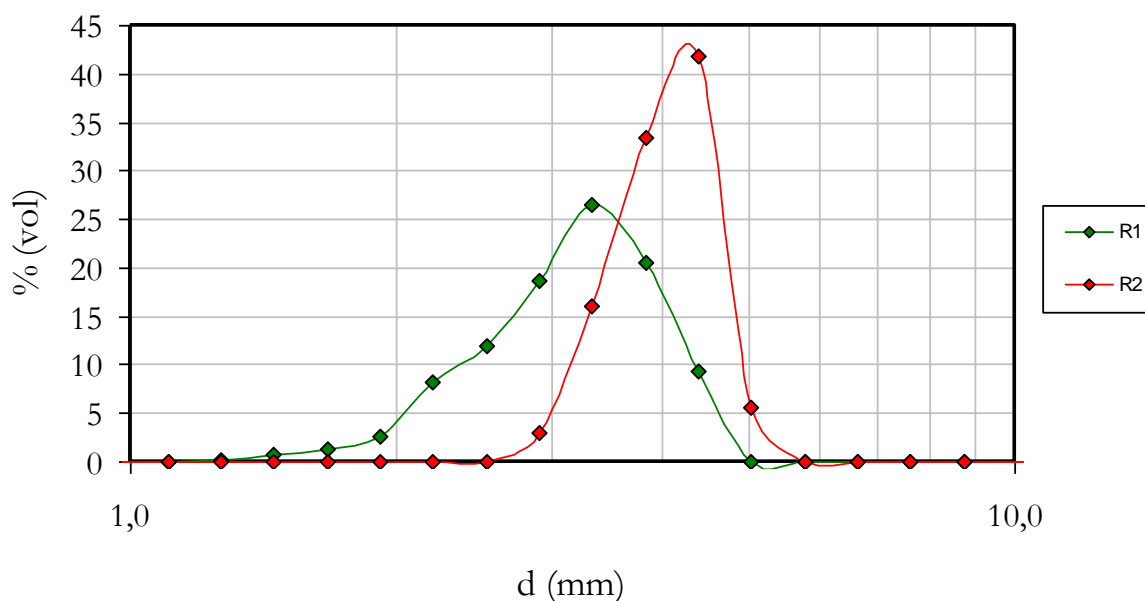


Figure 56 : Répartition des diamètres des granules des réacteurs R1 et R2. Les mesures sont faites à partir de photographies avec éclairage par en dessous analysée à l'aide du logiciel Visilog. Les résultats sont présentés en part du volume total de particules.

Les granules de R1 sont de tailles très variables par rapport à celles des granules de R2. La taille moyenne des granules de R1 est de $2,6 \pm 0,7$ mm de diamètre. Ceux de R2 sont un peu plus grands et mesurent en moyenne $3,8 \pm 0,5$ mm de diamètre.

II.3. Bilan

Comme on l'a vu, selon les procédés utilisés, les granules se distinguent par un certain nombre de propriétés. La table 9 répertorie quelques unes de ces propriétés caractérisant les granules des réacteurs R1 et R2.

Table 9 : Propriétés des granules des réacteurs R1 et R2.

	R1	R2
MES	35 $g.L^{-1}$	10 $g.L^{-1}$
MVS	25 $g.L^{-1}$	7 $g.L^{-1}$
SVI_{30}	16 $mL.g^{-1}$	90 $mL.g^{-1}$
Diamètre moyen	2,6 mm	3,8 mm
Diamètre maximum	4,5 mm	4,8 mm

Ce tableau permet en particulier de mettre en évidence de quelle façon les granules des réacteurs R1 et R2 se distinguent. On remarque notamment, que du fait de la présence de filaments à la surface des granules de R2, ces agrégats présentent une valeur de SVI_{30} beaucoup plus importante (ces structures abaissant la masse volumique globales des agrégats et freinant la décantation). Le réacteur R2 présente également une concentration en matière organique beaucoup plus basse. Enfin, on notera que les granules de ce réacteur ont des diamètres significativement plus importants. Ceci peut être également imputé à la présence des filaments qui vont offrir une protection physique des granules face aux contraintes hydrodynamiques.

III. Mesure de la résistance des granules aux contraintes hydrodynamiques

III.1. Test de résistance sur les granules de R1

Afin d'évaluer et de comparer la résistance des granules des deux réacteurs à des contraintes hydrodynamiques, nous avons mis au point un test en cuve agitée de 100 mL. Des premiers essais de contraintes en cuve agitée sont effectués sur des granules du réacteur R1. Pour cela, 1 g de MVS de granules tamisés à 2,82 mm a été placé dans 100 mL de PBS pH 7,5 dans la cuve agitée soumise à différentes vitesses d'agitation pendant 20 ou 40 min. Après cela, les dimensions des granules sont mesurées.

Différentes conditions sont testées afin de choisir une vitesse d'agitation générant des contraintes de cisaillement susceptibles de permettre l'évaluation de la cohésion des granules :

- 430 rpm 40 min
- 550 rpm 10 min
- 550 rpm 20 min
- 550 rpm 40 min
- 700 rpm 20 min
- 700 rpm 40 min

La figure 57 représente les images des granules prises avant et après traitement et utilisées pour les mesures de tailles d'agrégats. Sur ces photographies, on peut voir que l'accroissement de la durée du traitement et de la vitesse d'agitation entraînent toutes les deux une diminution de la taille des agrégats et l'apparition de fragments de granules aux formes plus irrégulières.

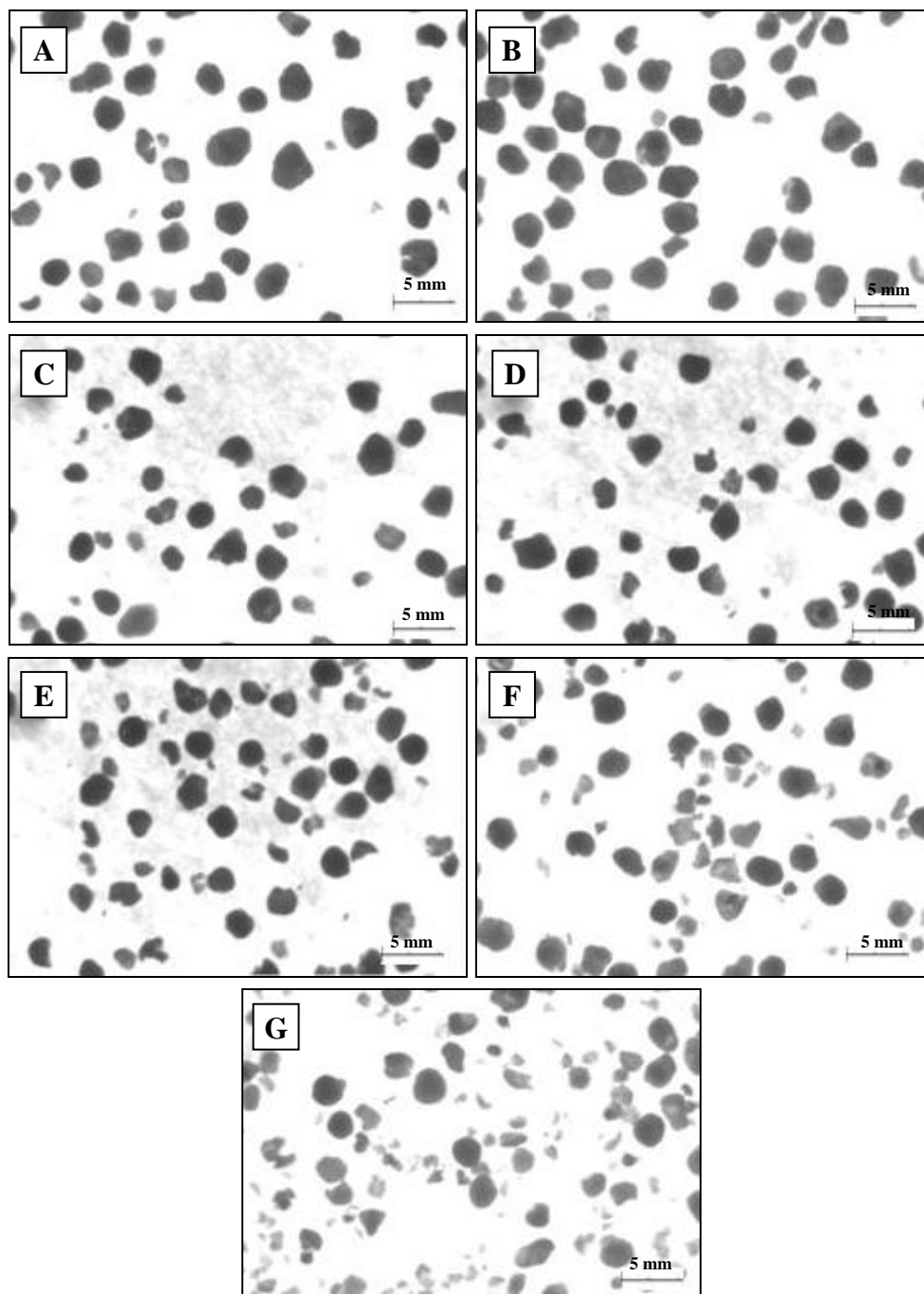


Figure 57 : Photographies, avec éclairage par en dessous, des granules natifs du réacteur R1 avant et après contraintes hydrodynamiques. Granules natifs tamisés à 2,82 mm (A) puis subissant des contraintes hydrodynamiques par agitation de 40 min à 430 rpm (B), de 10 min à 550 rpm (C), de 20 min à 550 rpm (D), de 40 min à 550 rpm (E), de 20 min à 700 rpm (F) et de 40 min à 700 rpm (G).

La figure 58 représente la distribution des diamètres des granules déduits de ces images, et la figure 59 représente les diamètres moyens pour chaque paramètre de contraintes. A la suite des contraintes appliquées pendant 40 min à 700 rpm, les agrégats étaient trop altérés pour réaliser les mesures de diamètres, c'est pourquoi ces résultats ne sont pas présentés en figure 58 et 59.

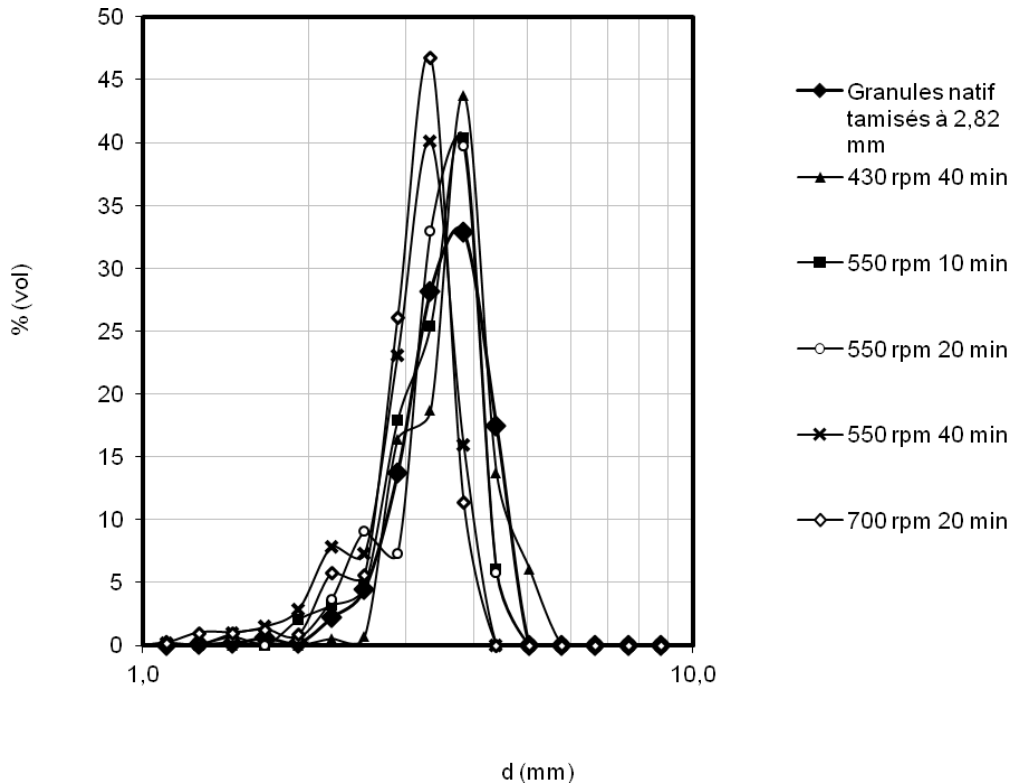


Figure 58 : Distribution des diamètres en part du volume total de particule des granules du réacteur RI tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL. Les mesures sont faites à partir de photographies avec éclairage par en dessous analysée à l'aide du logiciel Visilog.

Selon ces mesures, on constate peu de variations après traitement à 430 rpm pendant 40 minutes. En revanche, lorsque l'on augmente les puissances d'agitation, on constate des disparitions progressives des agrégats de grandes tailles au profit de fragments plus petits. Les fragments de tailles proches de 4,4 mm de diamètre représentent plus de 17 % des granules natifs. Cette proportion descend à 6 % pour les traitements à 550 rpm de 10 et 20 min. Pour les traitements de 40 min à 550 rpm et de 20 min à 700 rpm, les granules de grandes tailles, proches de 4,4 mm disparaissent complètement. Dans le cas des traitements à 550 rpm de 10 et 20 min, qui restent modérés, ces fragments de grandes tailles sont remplacés par des fragments de tailles proches de 3,8 mm. En effet, la quantité d'agrégats de ce calibre passe de 32 % dans le cas des granules non traités à 40 % du volume total d'agrégats avec ces traitements. Dans le cas des traitements plus intenses, ces fragments disparaissent également au profit de fragments encore plus petits. En effet, la diminution des fragments d'environ 3,8 mm de diamètre est compensée par l'apparition de nouveaux fragments d'environ 3,3 mm. Les fragments de 3,8 mm de diamètre passent de 32 % sans traitement, à 16 % du volume total d'agrégats avec un traitement de 40 min à 550 rpm, et à 11 % avec un traitement de 20 min à 700 rpm. Les fragments de 3,3 mm de diamètre, quant à eux, représentent 28 % du total dans le cas des granules natifs, et passent à 40 et 47 % du total après traitements de 40 min à 550 rpm et 20 min à 700 rpm. En outre, on note l'apparition progressive dans les échantillons traités de fragments de très petites tailles. En effet, les particules de diamètre inférieur à 2,2 mm ne représentent que 4 % du volumes dans les granules natifs, et passent à 5,2 % après traitement de 10 min à 550 rpm, à 5,1 % après traitement de 20 min à 550 rpm, à 13,2 % après traitement de 40 min à 550 rpm et à 10,1 % après traitement de 20 min à 7000 rpm,

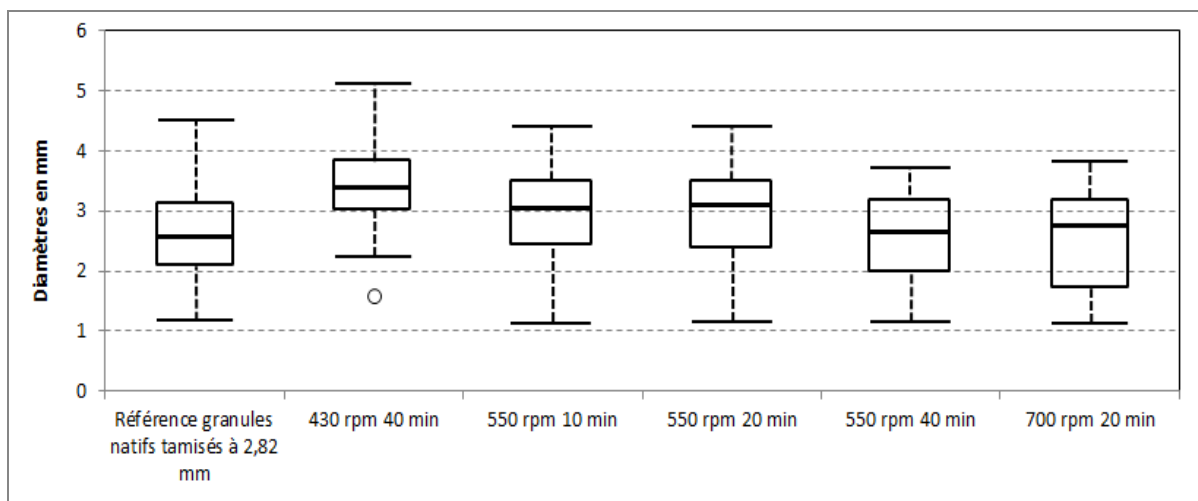


Figure 59 : Représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres des granules du réacteur R1 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL. Les mesures sont faites à partir de photographies avec éclairage par en dessous analysée à l'aide du logiciel Visilog. La barre horizontale en gras à l'intérieur de chaque boîte représente la valeur de diamètre médian. Les bords hauts et bas de la boîte représentent respectivement les 3èmes et 1ers quartiles. Les traits horizontaux aux bouts des lignes pointillées représentent les valeurs maximales et minimales des diamètres mesurés à l'exclusion de certaines valeurs exclues. Les valeurs exclues de cette représentation sont les valeurs à une distance de la valeur médiane deux fois et demi supérieure à l'écart entre le 1^{er} et le 3^{ème} quartile. Ces valeurs sont représentées par des cercles sur le graphique.

La représentation en boîtes à moustaches présentée en figure 6 confirme cette disparition des agrégats de grande taille par érosion progressive des granules. Les mesures effectuées sur les granules natifs sont problématiques puisque les diamètres mesurés apparaissent encore plus faibles qu'après contraintes.

Par la suite, on choisit de travailler à 550 rpm pour des périodes de 20 min car l'altération est observable mais modérée.

III.2. Test de résistance sur les granules de R2

Ces mesures ont été effectuées sur les granules du réacteur R2, selon le test de contraintes sélectionné précédemment, c'est-à-dire avec une agitation de 20 min à 550 rpm. Les résultats sont représentés sur la figure 7 qui montre la distribution des diamètres des granules, et sur la figure 60 qui montre le diamètre moyen obtenu avant et après application de la contrainte agitée.

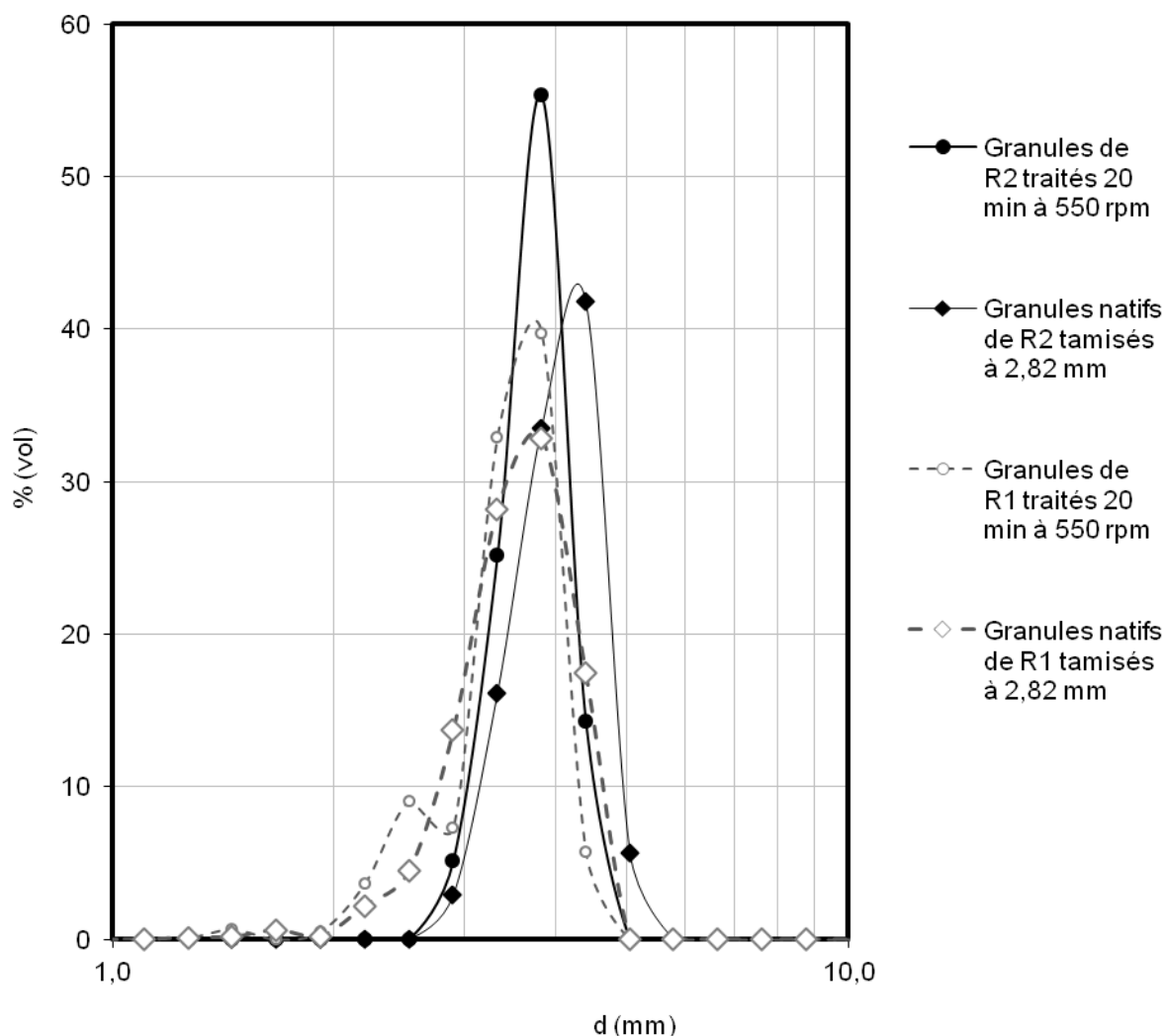


Figure 60 : Distribution des diamètres en part du volume total de particule des granules du réacteur R2 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL. Les mesures sont faites à partir de photographies avec éclairage par en dessous analysée à l'aide du logiciel Visilog.

Comme on peut le voir sur la figure 60, après un traitement de 20 min à 550 rpm, tout comme les granules de R1, les granules de R2 sont visiblement altérés. On observe une diminution significative de la proportion d'agrégats de diamètres élevés et l'augmentation de la proportion d'agrégats de plus petites tailles. Les agrégats d'environ 5 mm de diamètre qui représentaient 6 % du volume total disparaissent complètement et les agrégats de diamètre proche de 4,4 mm passent de 42 % à 17 % du volume total. A l'inverse, les agrégats d'environ 3,8 mm de diamètre passent de 33 à 42 %, ceux de 3,3 mm de diamètre environ passent de 16 à 25 % et ceux d'environ 2,9 mm de diamètre passent de 3 à 5 % du volume total. En revanche, contrairement aux granules de R1, les granules de R2 ne génèrent absolument pas de fragments de petite taille. On observe en effet une érosion de surface, accompagnée de la perte d'une partie des filaments caractérisant ces granules, mais aucune apparition de fragments d'agrégats de taille inférieure à 2,5 mm de diamètre.

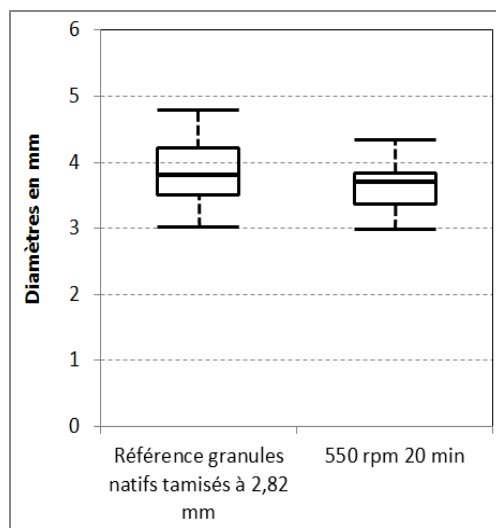


Figure 61 : Représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres des granules du réacteur R2 tamisés puis altérés par agitation en cuve de 100 mL. Les mesures sont faites à partir de photographies avec éclairage par en dessous analysée à l'aide du logiciel Visilog. La barre horizontale en gras à l'intérieur de chaque boîte représente la valeur de diamètre médian. Les bords hauts et bas de la boîte représentent respectivement les 3èmes et 1ers quartiles. Les traits horizontaux aux bouts des lignes pointillées représentent les valeurs maximales et minimales des diamètres mesurés à l'exclusion de certaines valeurs exclues. Les valeurs exclues de cette représentation sont les valeurs à une distance de la valeur médiane deux fois et demi supérieure à l'écart entre le 1^{er} et le 3^{ème} quartile. Ces valeurs sont représentées par des cercles sur le graphique.

La représentation en boîtes à moustaches présentée en figure 61 confirme les tendances observées sur la figure 60. Les contraintes hydrodynamiques appliquées pendant 20 min à 550 rpm font baisser le diamètre des agrégats la dispersion des diamètres, plus étroite pour les granules de R2 qu'elle ne l'était pour les granules de R1 semble diminuer dans ce cas à la suite des traitements.

I.1. Analyse de la stabilité des granules

Les résultats des mesures effectuées sur les deux réacteurs permettent d'évaluer le degré de résistance des granules comme mentionné par Nor Anuar et al. en 2009. En effet, ces auteurs soumettent différents types de granules à des contraintes hydrodynamiques générées par agitation dans une cuve standard de 2,0 L à une vitesse de 200 rpm. Ceci leur permet de déduire un taux de contraintes γ , exprimé en s^{-1} , qui permettra d'évaluer la puissance des contraintes appliquées aux agrégats. Ce paramètre γ est calculé grâce à la formule suivante :

$$\gamma = \frac{4\pi N T_v^2}{T_v^2 - D^2}$$

N = vitesse d'agitation (en s^{-1})
 D = diamètre des pales (en m)
 T_v = diamètre de la cuve (en m)

Dans le cas de l'étude de Nor Anuar et al. (2009), $N = 3,33 s^{-1}$, $D = 0,075 m$ et $T_v = 0,137 m$, et donc, ce paramètre vaut $61,4 s^{-1}$.

Dans le cas de notre étude, la géométrie des cuves utilisées n'est pas du tout standard. Par conséquent, il n'est pas possible d'appliquer ces calculs afin de mesurer la stabilité des granules de R1 et R2. Cependant, étant donné la proximité des paramètres de notre test de résistance aux contraintes hydrodynamiques avec ceux du test de Nor Anuar et al. (2009), il est possible de calculer une estimation la valeur du paramètre γ à environ 140 s^{-1} , valeur plus de deux fois supérieures à celle de l'article publié. En outre, la durée des tests de contraintes choisie par Nor Anuar et al. (2009) est de 10 min, soit également deux fois moins que dans notre cas où nous soumettons nos granules à 20 min d'agitation. D'après ces données, les contraintes que nous appliquons seraient donc environ quatre fois plus fortes.

Les niveaux de résistances aux contraintes hydrodynamiques sont ensuite évalués en fonction d'un « pourcentage de variation » Σ , correspondant au pourcentage de changement de diamètre des granules au cours du traitement hydrodynamique. Selon ces calculs, Σ vaut 5,4 % dans le cas de R1 et vaut 5,5 %, dans le cas de R2. D'après l'échelle proposée par Nor Anuar et al. (2009), ces granules sont donc considérés comme très résistants (valeur de Σ inférieure à 10). D'autant plus que les contraintes que nous appliquons étant plus fortes que celles de Nor Anuar et al., (2009), il est probable que cette valeur de coefficient Σ soit surestimée.

IV. Localisation des EPS et des microorganismes au sein des granules

IV.1. Observation des granules natifs

IV.1.1. Répartition globale

Afin de mieux comprendre la répartition des microorganismes et de certains types d'EPS au sein des granules, nous avons effectué des observations au microscope confocal de coupes de granules de $40 \mu\text{m}$ d'épaisseur ayant subi différents marquages fluorescents. Les protéines ont été marquées par le FITC (émission dans le vert), ciblant les amines primaires alors que les polysaccharides portant des résidus glucose ou mannose ont été détectés par la concanavine A couplée à de la rhodamine (émission dans le rouge). Ces marquages ont été combinés à ceux ciblant les microorganismes réalisés soit par FISH avec des sondes spécifiques des bactéries AOB et NOB, soit par coloration de l'ADN au DAPI pour détecter l'ensemble des bactéries.

La mise au point des outils de marquage a été effectuée sur les granules du réacteur R1 qui présentent des activités microbiennes diversifiées (autotrophes et hétérotrophes) et des caractéristiques physiques intéressantes en matière de densité et cohésion.

La figure 62 représente les marquages par la concanavine A, combinés aux marquages au DAPI et aux marquages FISH des bactéries AOB et NOB (figure 62 A et B respectivement) réalisés sur les granules natifs et la figure 63 représente les marquages par le FITC combinés aux marquages au DAPI et aux marquages FISH des bactéries AOB et NOB (figure 63 A et B respectivement) réalisés sur les granules natifs.

Ces observations nous permettent de mieux comprendre l'organisation interne des agrégats étudiés, cependant, il est important de rappeler que la localisation des différents polymères de la matrice d'EPS ainsi que des différentes espèces microbiennes présentes dans les granules dépend des paramètres de culture des granules. Le lien direct entre ces paramètres et la structure interne des granules étant difficile à expliquer, les résultats que nous observons ici ne sont pas facilement applicables aux agrégats cultivés dans des conditions différentes. En outre, l'organisation interne d'un agrégat dépend également de son âge, de sa taille et des épisodes successifs de sa formation, il est difficile, d'affirmer la répétabilité des observations effectuées sur un granule unique d'un réacteur en contenant des millions.

Cependant, selon les observations effectuées, au centre des agrégats, au-delà de 0,5 mm de profondeur, on aperçoit sur toutes les observations réalisées, un marquage discontinu, parfois par plusieurs fluorophores. Il ne s'agit en fait ni de microorganismes, ni d'EPS, mais d'un marquage aspécifique du cœur minéral volumineux des agrégats. Ce cœur minéral a été en particulier caractérisé par Mañas et al. (2012). Lors de cette étude réalisée sur les granules du réacteur R1, des analyses de ce cœur minéral réalisées par spectroscopie raman, microscopie électronique à balayage couplée à de la spectroscopie de rayons X à dispersion énergétique et diffraction aux rayons X montrent qu'il est principalement composé de cristaux d'hydroxyapatite, qui sont des cristaux composés de calcium et de phosphate.

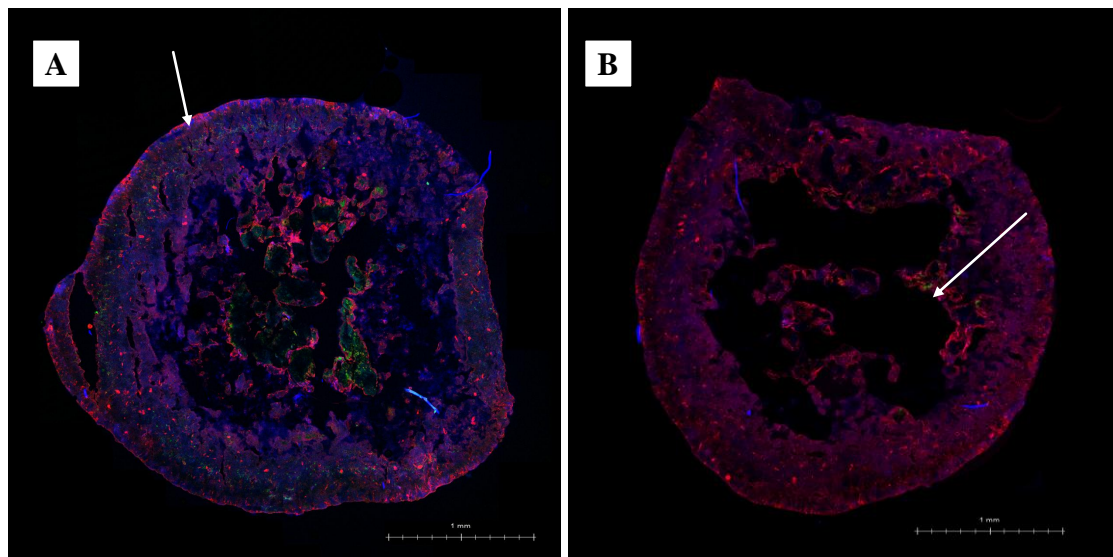


Figure 62 : Répartition globale des polysaccharides à résidus glucose ou mannose dans les granules de R1. Les granules sont coupés par un cryomicrotome, puis marqués par une méthode FISH pour la détection des bactéries AOB (A, flèche) et NOB (B, flèche) (en vert), ou par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les polysaccharides possédant des résidus glucose et mannose sont marqués par la concanaviline A (en rouge). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1).

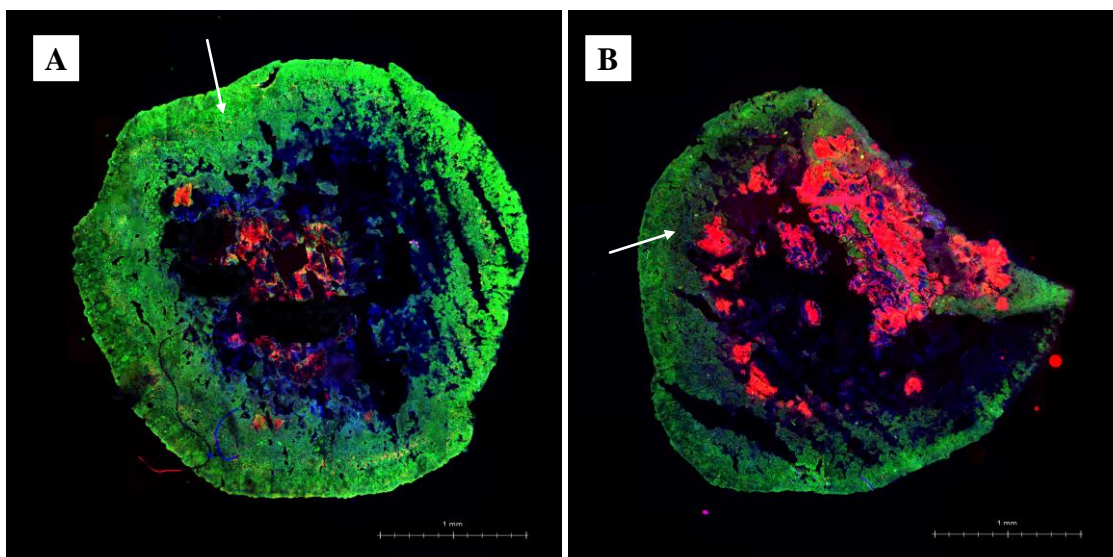


Figure 63 : Répartition globale des protéines dans les granules de R1. Les granules sont coupés par un cryomicrotome, puis marqués par une méthode FISH pour la détection des bactéries AOB (A, flèche) et NOB (B, flèche) (en rouge), ou par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les protéines sont marquées par le FITC (en vert). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1).

Selon ces images, les microorganismes localisés par le marquage par le DAPI sont répartis de manière assez homogène sur tout le pourtour des agrégats. Selon les granules observés, l'implantation des microorganismes occupe entre 0,5 et 1 mm d'épaisseur de granule en partant de la surface. Les microcolonies des granules couvrant l'ensemble de cette zone, il est impossible de les distinguer les unes des autres avec ce marquage et à ce grossissement.

Les marquages FISH observés sur les figures 62 et 63 montrent une implantation de microcolonies de bactéries AOB apparaissant en pointillé sur les images, sur une couronne à environ 0,3 mm de la surface du granule (figures 62.A. et 63.A., flèches). Les microcolonies de bactéries NOB, également en pointillés sur les images, apparaissent plus dispersées et sont marquées entre la surface et environ 0,4 mm de profondeur dans le granule (figures 62.B. et 63.B., flèches).

Comme le montrent les images de la figure 62, le marquage de résidus glucose et mannose par la concanavaleine A a une localisation très similaire à celui du marquage DAPI. On observe donc la présence de polysaccharides contenant des résidus mannose et glucose sur l'ensemble de la zone occupée par les microorganismes. Cependant, contrairement au marquage DAPI, le marquage des polysaccharides par la concanavaleine A n'est pas du tout homogène. En effet, on observe à la surface des agrégats marqués la présence d'une fine pellicule de polysaccharides plus denses qui semblent recouvrir entièrement les granules. À l'intérieur des agrégats, les polysaccharides marqués semblent également être condensés en certains points. Il est possible que ces points correspondent à l'emplacement de microorganismes particulièrement producteurs de polysaccharides. On note aussi la présence de formes circulaires pouvant atteindre jusqu'à 0,25 mm de diamètre, généralement localisées dans des parties assez profondes des granules, en bordure de cœur minéral. D'après la taille importante de ces formes, il pourrait s'agir de gangues de polysaccharides recouvrant des associations de plusieurs microcolonies de même espèce bactérienne colonisant les parties profondes des agrégats.

Cette implantation est différente de celle observée en 2005 par McSwain et al. suite à des marquages par la concanavaleine A de granules alimentés par du milieu synthétique avec un rapport C/N de 10,7 et également coupés au cryomicrotome. En effet, lors de cette étude, le marquage par la lectine révèle une localisation très périphérique des polysaccharides qui ne sont pas observés à plus de 50 μm de la surface des agrégats. Les implantations observées par Adav et Lee, 2008a sont plus similaires à ce que nous observons. Selon leur marquage, en effet, leurs granules alimentés par de l'eau usée synthétique présentant un rapport C/N de 1,4 sont caractérisés par une localisation plus profonde des polysaccharides visibles sur les 0,3 à 0,4 premiers millimètres des agrégats.

L'implantation des protéines dans les granules est différente de celle des polysaccharides. En effet, comme on peut le constater sur la figure 10, le marquage au FITC est très intense à l'extrême périphérie des agrégats, dans les premiers 0,1 mm puis décroît régulièrement alors que l'on s'enfonce dans l'agrégat. Le marquage par le FITC que nous observons n'est, lui non plus, pas homogène mais apparaît par plaques de moins de 50 μm de diamètre. Ces formes correspondent peut-être aux emplacements des microcolonies productrices de protéines.

Ces observations ne sont pas tout à fait en accord avec celles de Adav et Lee (2008) et McSwain et al. (2005) qui observent une implantation généralisée des protéines marquées par le FITC dans l'ensemble de leurs agrégats granulaires. Cependant, cette différence peut s'expliquer par le fait que les granules que nous étudions, contrairement à ceux présentés dans ces deux articles, possèdent un cœur minéral volumineux et dépourvu d'EPS.

IV.1.2. Répartition locale

Afin de mieux comprendre comment les EPS sont organisés autour des microorganismes, les images confocales des coupes de granules ont également été observées à des échelles plus locales, en utilisant les mêmes marqueurs que précédemment pour les protéines et les polysaccharides. Le marquage des bactéries AOB est effectué par FISH avec des sondes spécifiques alors que celui de l'ensemble des bactéries est obtenu avec un mélange de plusieurs sondes ciblant un large spectre de micro-organismes (mélange Eub mix).

Ce type de visualisation permet d'observer individuellement les microcolonies de bactéries qui apparaissent sous forme de taches composées de pointillés plus ou moins denses, chaque point correspondant à une bactérie (figures 64 et 65).

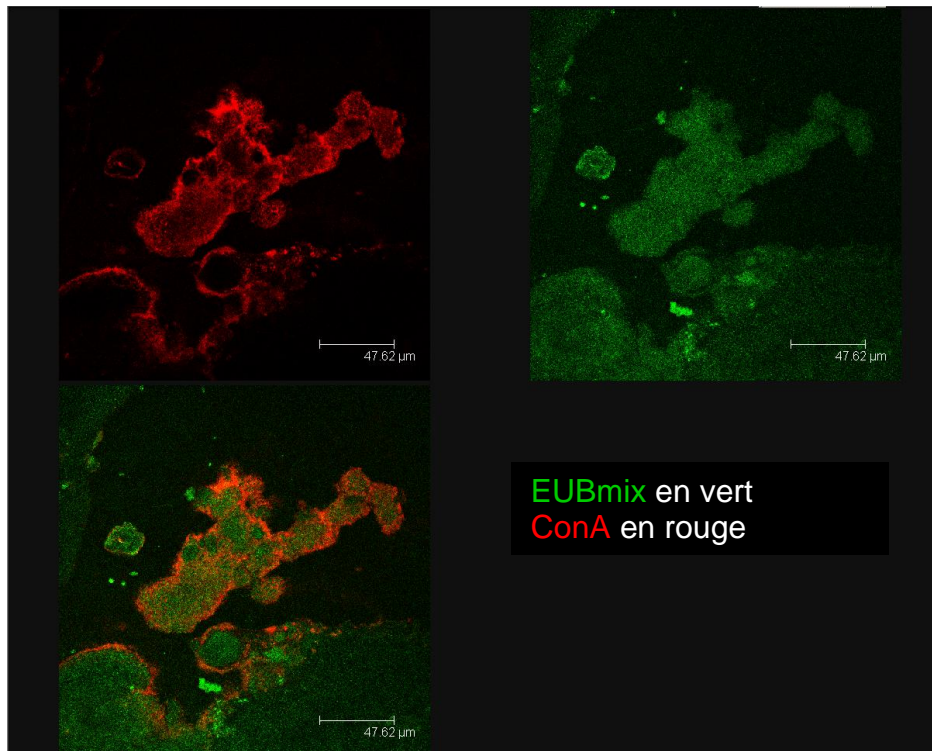
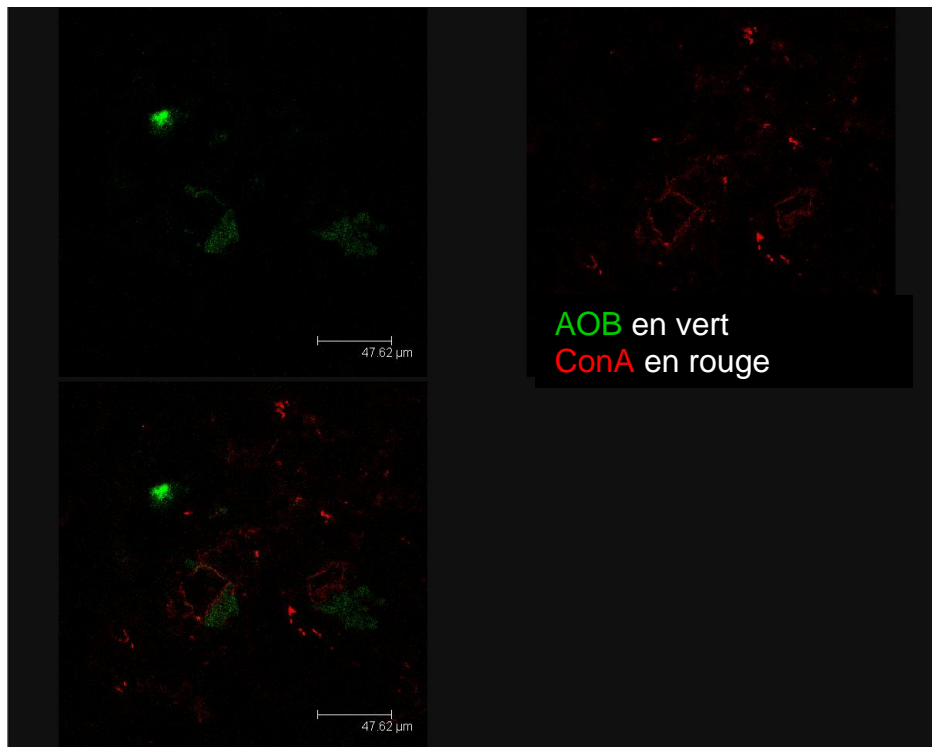
A**B**

Figure 64 : Analyse à l'échelle locale de la distribution des polysaccharides et des bactéries dans les granules de R1 natifs. Les granules sont coupés par un cryomicrotome, puis marqués par une méthode FISH pour la détection de bactéries AOB ou de toutes les bactéries (EUB mix), et à la Concanavaline A pour les polysaccharides (résidus glucose et mannose).

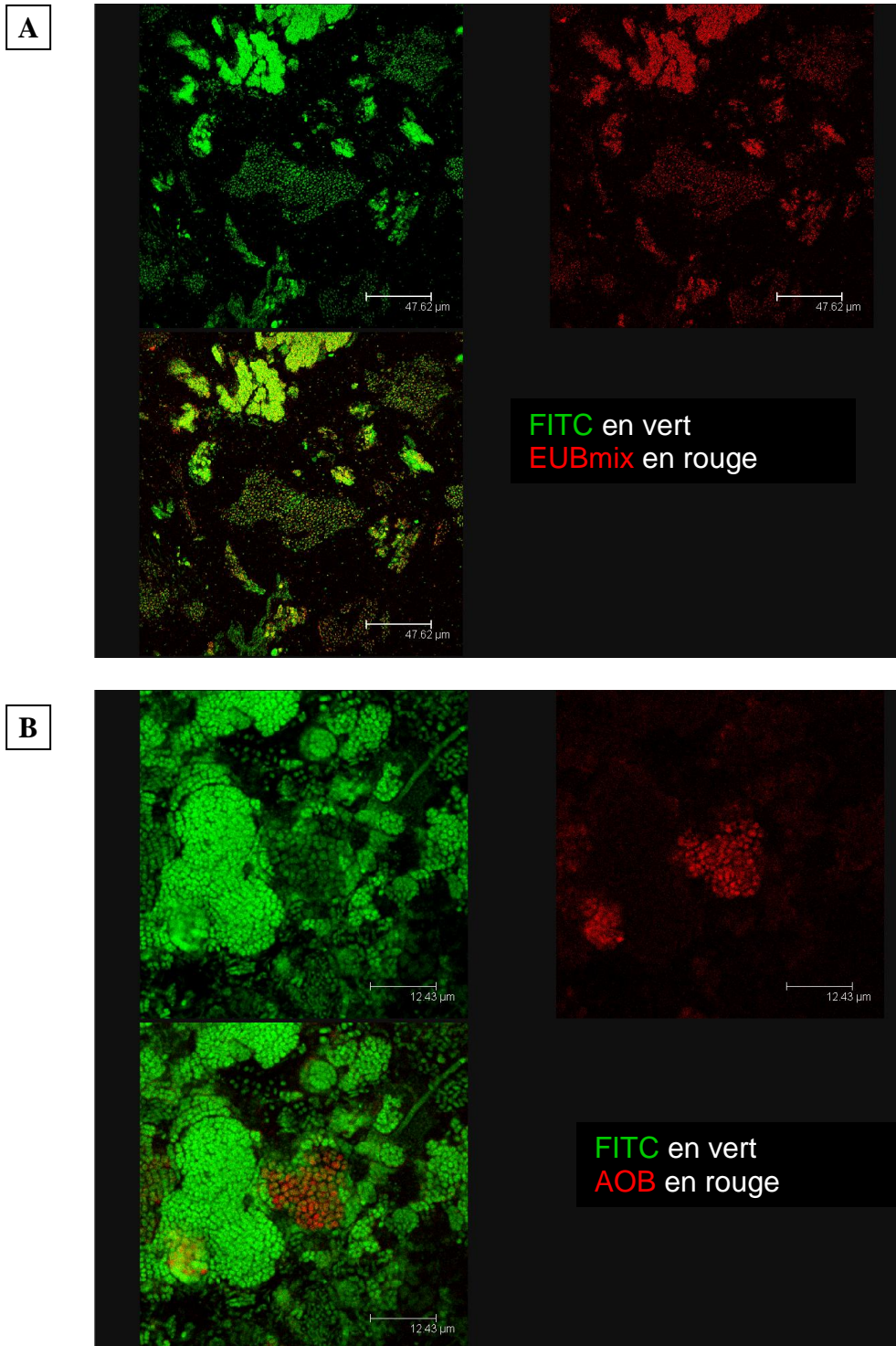


Figure 65 : Analyse à l'échelle locale de la distribution des protéines et des bactéries dans les granules de R1 natifs. Les granules sont coupés par un cryomicrotome, puis marqués par une méthode FISH pour la détection de bactéries AOB ou de toutes les bactéries (EUB mix), et au FITC pour les protéines (marquage des amines secondaires).

Sur la figure 11.A., le marquage par la concanaviline A nous permet d'observer précisément les gangues de polysaccharides autour de microcolonies. Ces gangues entourent les regroupements de microorganismes de différentes dimensions. On peut les voir entourer des microcolonies de bactéries de tailles allant de 5 à 30 μm. Cependant, elles ne semblent pas entourer toutes les microcolonies. En particulier, comme on peut le voir sur figure 11.B. les AOB en sont dépourvus.

Il est difficile d'estimer réellement la composition chimique de ces structures. En effet, la concanavoline A utilisée pour le marquage est spécifique des résidus mannoses et glucoses, qui sont très représentés dans les polymères osidiques. En particulier, il existe de nombreuses formes de glucanes (polymères de glucoses) dans le vivant et ils seront tous marqués par la concanavoline A. Ces 2 oses peuvent également être présents au sein de lipopolysaccharides ou de glycoprotéines.

Le marquage par le FITC à ce niveau de grossissement confirme la couverture protéique de l'ensemble des microcolonies. Au sein des microcolonies, les protéines marquées sont localisées à proximité immédiate des cellules. Ceci est particulièrement visible sur la figure 12.A. où la colocalisation des marquages EUB mix en rouge et FITC en vert apparaît en jaune-orangé. Un grossissement encore plus important après marquage des bactéries AOB (Figure 12.B.) permet de voir que le marqueur FITC marque aussi les microcolonies d'AOB. On peut voir également sur ces images que, si le FITC semble marquer absolument toutes les microcolonies, la forme que prend ce marquage varie d'une microcolonie à l'autre, et sans doute, d'une espèce bactérienne à l'autre.

D'après les résultats de ce marquage, on a également une forte présence protéique à proximité des cellules des agrégats. Cependant, il est difficile d'affirmer que ces protéines sont des EPS. En effet, le marqueur se liant à toutes les protéines, étant donné la proximité avec les microorganismes, il peut aussi bien s'agir de protéines membranaires et en particulier de protéines de la membrane externe de bactéries à gram négatif.

IV.2. Observation des effets des contraintes hydrodynamiques

Afin de mieux comprendre les effets des contraintes hydrodynamiques sur les agrégats, des marquages de granules en coupes ont été également réalisés sur des granules ayant subi une incubation de 24 h dans le PBS 1 X suivie de contraintes en cuve agitée. Les images présentées en figure 66 illustrent de marquage de la Concanavoline A et du DAPI sur ces granules ainsi que celui des bactéries AOB et NOB. La comparaison des marquages AOB et NOB sur ces granules natifs ne révèle pas, à ce grossissement, de différence notable.

Comme décrit précédemment (figure 62), on retrouve la localisation des polysaccharides ciblés par la lectine à la périphérie des granules natifs sous forme d'une ligne discontinue ainsi que sur des zones bien définies et réparties plus en profondeur (figure 66.A. et C.). Lorsqu'on observe les images C et D de la figure 66, ce profil semble inchangé après application de la contrainte de cisaillement définie précédemment.

Une analyse quantitative de la répartition et de l'intensité des marquages Concanavoline A (en rouge) et DAPI (en bleu) a été réalisée avec le logiciel ImageJ (figure 66 E., F., G., H.). Les diagrammes présentés illustrent les intensités de fluorescence relatives (axe des ordonnées) mesurées après analyse des images entre la périphérie (0%, axe des abscisses) et le centre du granule (100%, axe des abscisses).

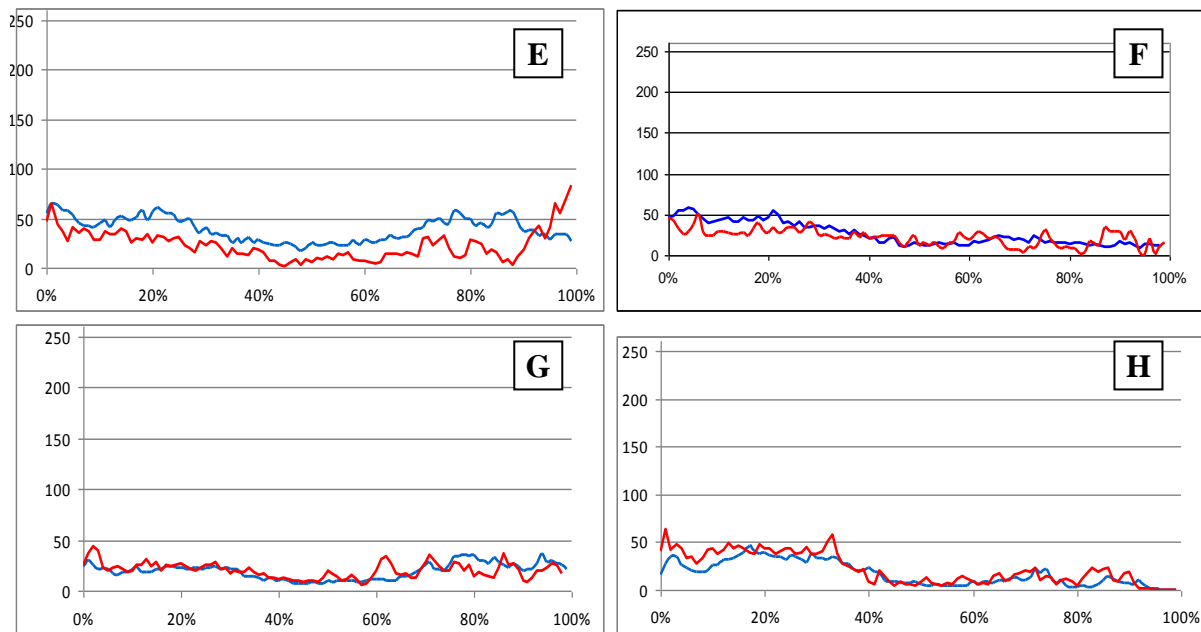
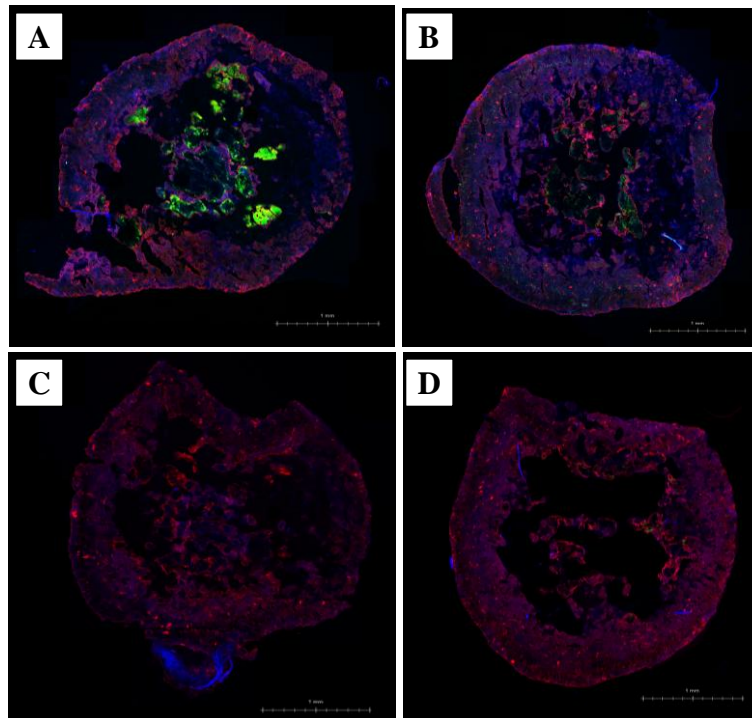


Figure 66 : Répartition des polysaccharides et micro-organismes dans les granules de RI soumis à une contrainte hydrodynamique (A,C et E,G) ou natifs (B,D et F,H). Après incubation de 24 h à 35 °C dans le PBS 1X pH 7,5, les granules sont incubés en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupés par un cryomicrotome, puis marqués par une méthode FISH pour la détection de bactéries AOB (A, en vert) et NOB (C, en vert). Toutes les coupes marquées par de la concanavaleine A pour la détection des polysaccharides à glucose et mannose (en rouge) puis au DAPI pour la détection des cellules(en bleu). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1). Les courbes, effectuées à l'aide du programme ImageJ, représentent les profils d'intensité de marquage par la concanavaleine A et le DAPI entre la périphérie (0%) et le centre des agrégats (100%) (E : analyse image A, F : analyse image B, granules natifs, G : analyse image C., granules altérés, H : analyse image D, granules natifs).

Comme le montre les profils de marquages des granules natifs (figure 66.F. et H.), les courbes de répartition des polysaccharides (Concanavoline A) et des bactéries (DAPI) sont très similaires. Tout comme le marquage DAPI, le marquage par la concanavoline A est décroissant depuis la périphérie (0%) jusqu'à 40% du rayon. En profondeur, le marquage est quasi-absent (40 à 70%). Au delà de 80% on observe une fixation non spécifique des trois marqueurs fluorescents par les minéraux au centre du granule.

Des profils équivalents sont observés en figure 66.E. et G. Par conséquent, on peut déduire de cette analyse semi-quantitative par ImageJ qu'il n'y a pas d'altération du marquage par la Concanavoline A après contraintes hydrodynamiques.

Les images de granules après contraintes sont en accord avec ces constatations. En effet, aucune différence notable de marquage n'est observable entre images A et C correspondant aux granules ayant subi une incubation dans le PBS et un traitement hydrodynamique, et les images B et D de la figure 66, correspondant aux granules natifs.

Les profils des marquages FITC sur les granules natifs présentés sur la figure 67.B. et D. confirment bien que la répartition des protéines dans le granule est différente de celle des polysaccharides. En périphérie et jusqu'à 25 % du rayon, les polypeptides sont effectivement très représentés. Sur cette zone, l'intensité du marquage diminue de manière modérée alors que l'on s'enfonce dans l'agrégat. Puis, au-delà de 25 %, et jusqu'à 50 ou 60 % selon le granule considéré, le marquage FITC diminue rapidement jusqu'à disparaître complètement. Entre 60 et 80 %, aucun marquage de protéine n'est observé bien que des cellules soient encore marquées par le DAPI dans cette zone.

Les profils observés en figure 67.E. et G. étant très proches, on peut conclure de cette analyse semi-quantitative par ImageJ que le marquage au FITC n'est pas affecté par l'incubation dans le PBS et les contraintes hydrodynamiques.

Les images de granules après contraintes sont en accord avec ces constatations. En effet, aucune différence notable de marquage n'est observable entre images A et C correspondant aux granules ayant subi une incubation dans le PBS et un traitement hydrodynamique, et les images B et D de la figure 67, correspondant aux granules natifs.

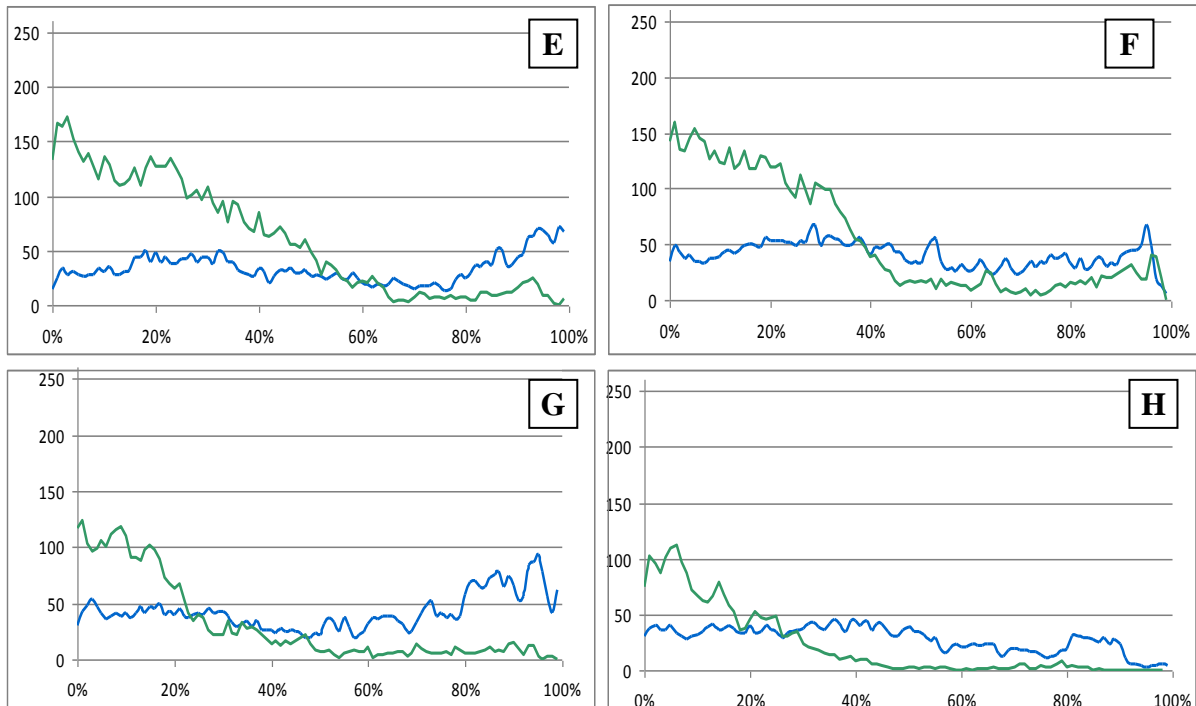
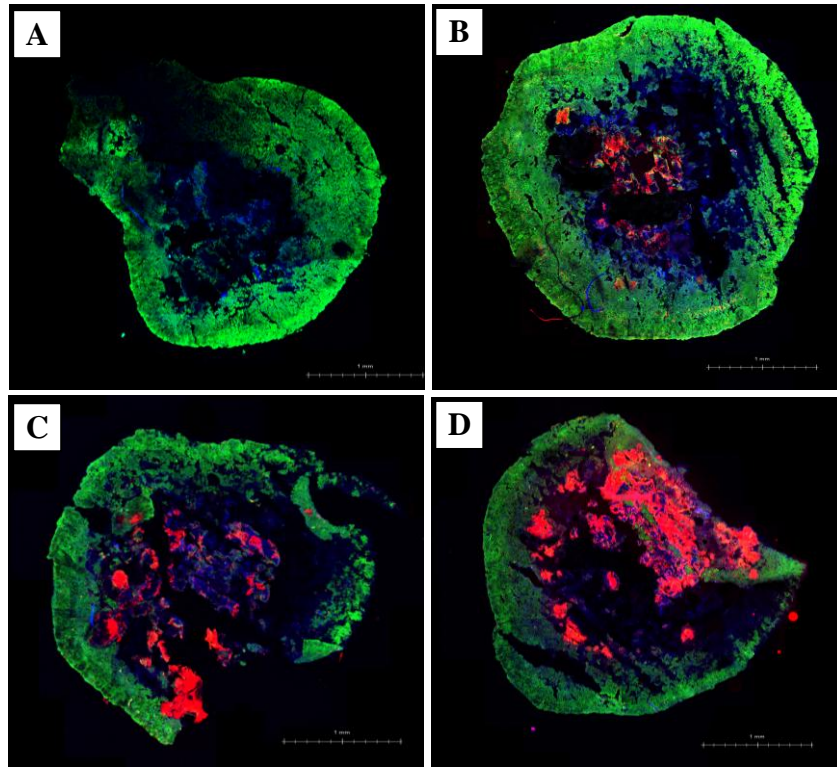


Figure 67 : Répartition des protéines et micro-organismes dans les granules de RI soumis à une contrainte hydrodynamique (A,C et E,G) ou natifs (B,D et F,H). Après incubation de 24 h à 35 °C dans le PBS 1X pH 7,5, les granules sont incubés en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupés par un cryomicrotome, puis marqués par une méthode FISH pour la détection de bactéries AOB (A, en rouge) et NOB (C, en rouge). Toutes les coupes sont marquées par du FITC pour la détection des protéines (en vert) puis au DAPI pour la détection des cellules(en bleu). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1)

Les courbes, effectuées à l'aide du programme ImageJ, représentent les profils d'intensité de marquage par le FITC et le DAPI entre la périphérie (0%) et le centre des agrégats (100%) (E : analyse image A, F : analyse image B, granules natifs, G : analyse image C., granules altérés, H : analyse image D, granules natifs).

V. Conclusion

Les agrégats que nous étudions sont donc caractérisés par un ensemble de propriétés physiques, chimiques et microbiologiques qui les distinguent des autres agrégats. En particulier, leurs tailles importantes et leurs vitesses de décantation élevées, mesurées par leur SVI, les classent parmi les agrégats de type granulaire.

Les activités métaboliques de leurs populations bactériennes leur permettent en outre de réaliser avec efficacité le retraitement des déchets organiques dissouts riches en carbone et en azote.

Nous avons aussi pu établir certaines différences au niveau des propriétés physiques entre les granules des deux réacteurs. En effet, les valeurs du paramètre SVI sont différentes et les granules de R2 décantent beaucoup plus lentement car leur SVI_{30} est de 90 mL.g^{-1} contre 16 mL.g^{-1} pour les granules de R1. Par rapport aux granules de R1, les granules de R2 sont de taille plus importante et ceci est aussi lié à leur morphologie assez particulière. Nous avons vu que les morphologies des granules des deux réacteurs étaient nettement distinctes, les granules de R1 étant plus lisses et condensés, et les granules de R2 présentant de long filaments à leur surface. Enfin, ces agrégats de R1 sont caractérisés par des activités hétérotrophes plus réduites que ceux du réacteur R2 mais des activités autotrophes plus importantes.

Les observations confocales effectuées à différents grossissements nous permettent de mieux comprendre comment les EPS de nature polyosidique et polypeptidique sont répartis dans le granule. En particulier, nous avons pu voir que la répartition de ces deux types d'EPS n'était pas la même. Ceci est vrai si l'on considère les granules de manière globale, mais également si on observe les répartitions locales des marquages. Nous avons vu que les protéines forment une matrice très dense, directement en contact avec les cellules, et couvrant complètement les microcolonies. Toutefois, il est impossible d'affirmer que ces structures sont bien des gangues de protéines entourant des cellules car avec le FITC, il est difficile de savoir si les protéines sont des EPS ou des composants de membranes cellulaires. Pour en savoir plus sur ce sujet, il serait possible d'avoir recours à d'autres types de marquages spécifiques, ciblant notamment les protéines des membranes externes des bactéries à gram négatif et les glycoprotéines. Un marquage plus spécifique de ces molécules pourrait être effectué grâce à certaines lectines ciblant les oses des résidus glucidiques des glycoprotéines. Dans ce cadre, il serait possible, en particulier, d'effectuer des marquages des granules par la WGA (Wheat Germ Agglutinin), une lectine de germe de blé ciblant spécifiquement les résidus N-acetyl-D-glucosamine et l'acide sialique. L'analyse des EPS extraites de nos granules pourrait également nous éclairer car cela nous permettrait de séparer les protéines EPS de celles appartenant aux membranes cellulaires. Le marquage par la concanavaleine A quant à lui, montre que les polysaccharides forment des gangues fines mais très compactes autour des microcolonies de bactéries et autour de groupes de microcolonies.

Ces distributions suggèrent aussi que la présence de ces molécules dépend des métabolismes bactériens. En effet, on remarque que les marquages par la concanavaleine A et par le FITC ne sont pas similaires d'une microcolonie bactérienne à l'autre. Le lien entre le métabolisme bactérien et la nature des EPS produits a déjà été mis en évidence à l'échelle du granule entier par Durmaz et Sanin (2001) qui remarquent qu'un rapport C/N fort entraîne une concentration en polysaccharides plus importante dans les EPS et qu'à l'inverse, un rapport C/N faible favorise une forte concentration en protéines. A l'échelle des microcolonies, Lemaire et al., 2008a observent également des variations de la composition en EPS en fonction des espèces bactériennes.

Dans le cas des bactéries AOB qui sont marquées spécifiquement, les microcolonies observées montrent un marquage FITC faible et surtout, aucun marquage par la concanavaleine A. Il est donc possible que, au sein des granules de R1, les bactéries AOB soient de faibles productrices de protéines et pas du tout de polysaccharides et s'entoureraient alors d'une matrice lâche de polypeptides. Il est possible que cette incapacité à produire des polysaccharides soit une caractéristique propre aux

organismes à métabolisme nitrifiant. En effet, selon Yang et al. (2005), lorsque la concentration en azote de l'alimentation est faible, et donc également que le ratio C/N est élevé, les métabolismes nitrifiants des granules sont favorisés, et c'est cela qui entraîne un abaissement de la concentration en polysaccharides dans les EPS. Cependant, dans le cas de notre étude, le nombre d'observations effectuées est trop peu important pour réellement conclure sur ce sujet. Pour pouvoir réellement établir une corrélation entre espèces bactériennes et localisation des EPS dans le granule, il faudrait donc réaliser davantage d'observation sur un plus grand nombre d'agrégats. Pour cela, il apparaît également essentiel de diversifier les sondes FISH utilisées afin de détecter la présence d'autres types bactériens présents dans les granules et ainsi pouvoir distinguer les différents comportements quant à la production des EPS.

Des tests de résistance aux contraintes hydrodynamiques ont également permis de mettre en évidence la résistance très élevée des agrégats que nous étudions selon l'échelle mise au point par Nor Anuar et al. (2009). En effet, les valeurs mesurées de Σ , dans le cadre de notre étude sont de 5,4 % dans le cas de R1 et de 5,5 % dans le cas de R2, donc inférieures à 10 % dans les deux cas, ce qui les classe d'emblée parmi les granules les plus stables.

Les fonctionnalités épuratrices, la présence d'EPS diversifiées visualisées par microscopie confocale ainsi que les propriétés cohésives de leur matrice ont orienté notre choix sur les granules du réacteur R1 pour initier l'analyse des EPS et de leur rôle éventuel dans la cohésion et la stabilité des granules.

Chapitre 4 : Extraction et caractérisation des EPS des boues granulaires

I. Extraction des EPS de granules

En permettant de les étudier en solution, l'extraction des EPS des granules peut apporter de nombreuses informations sur la matrice des agrégats bactériens étudiés. En effet, à condition d'obtenir un échantillon représentatif des polymères de la matrice, cela peut nous permettre de mieux connaître la nature des EPS et leurs propriétés chimiques.

Comme nous l'avons vu dans la partie étude bibliographique (chapitre 1, table 1), les procédés utilisés pour extraire les EPS des agrégats bactériens ne sont pas adaptés au cas particulier des granules. En effet, en raison de la cohésion élevée de ces agrégats, les méthodes utilisées sont soit trop peu efficaces et ne permettent pas d'extraire une quantité représentative d'EPS, soit trop intenses, et présentent un risque trop élevé de lyse cellulaire ce qui a pour conséquence de mêler aux EPS, des molécules intracellulaires qui vont perturber les analyses.

C'est pourquoi notre objectif a été de mettre au point une méthode d'extraction qui ne présenterait pas ces problèmes, c'est-à-dire présentant un rendement d'extraction relativement élevé mais sans contamination des EPS par des composés intracellulaires. Pour cela, nous avons décidé de combiner séquentiellement trois méthodes différentes d'extraction ciblant chacune trois types différents d'interaction moléculaires pouvant intervenir dans la cohésion des EPS. Une étape mécanique permet de déstabiliser les liens intermoléculaires de manière aspécifique, puis, une première étape chimique cible les liaisons hydrophobes et une seconde étape chimique déstabilise les interactions ioniques.

Outre de permettre l'extraction d'une quantité importante d'EPS, ce type d'approche devrait permettre également un fractionnement des polymères en fonction de leurs propriétés chimiques.

Au sein de nos granules, les réacteurs étant alimentés uniquement par des molécules organiques simples (acétate, glucose, éthanol et propionate), on considère que la formation de substances humiques et substances humiques « like » par dégradation partielle de matières organiques par les microorganismes est un phénomène limité. De même, comme le montrent un certain nombre d'articles traitant de l'extraction des EPS des granules (Simon et al., 2009, Wang et al., 2006, Adav et Lee, 2008), les acides nucléiques ne composent généralement qu'une fraction très minoritaire de la matrice d'EPS des granules. Par conséquent, au cours de cette étude, nous assimilerons la quantité totale d'EPS des granules à la somme des quantités de protéines et de polysaccharides dosés.

I.1. Application du protocole multi-méthodes

La stratégie d'extraction des EPS que nous avons utilisée dans un premier temps a été mise au point par Monique Ras lors de sa thèse pour l'extraction des EPS des floes de boues activées (Ras et al., 2008) et des biofilms (Ras et al., 2011). Lors de ces expériences, les étapes mécaniques étaient assurées par une sonication durant 2 min avec la sonde à ultrason Vibra Cell, BIOBLOCK, puis elles étaient suivies d'une première étape d'extraction chimique dans le tampon PBS pH 7,4 Tween 0,25 % puis d'une seconde en tampon Tris-HCl pH 8 EDTA 2 %. Ce même protocole, que nous appelons protocole de référence, a été utilisé pour extraire les EPS des granules aérobies du réacteur R1 utilisés pour le traitement de l'azote (SVI_{30} : 16 mL.g⁻¹, activité mixte autotrophe hétérotrophe). Les protéines et les polysaccharides contenus dans chacun des extraits obtenus ont ensuite été quantifiés par dosage. La figure 68 schématise le déroulement du protocole d'extraction.

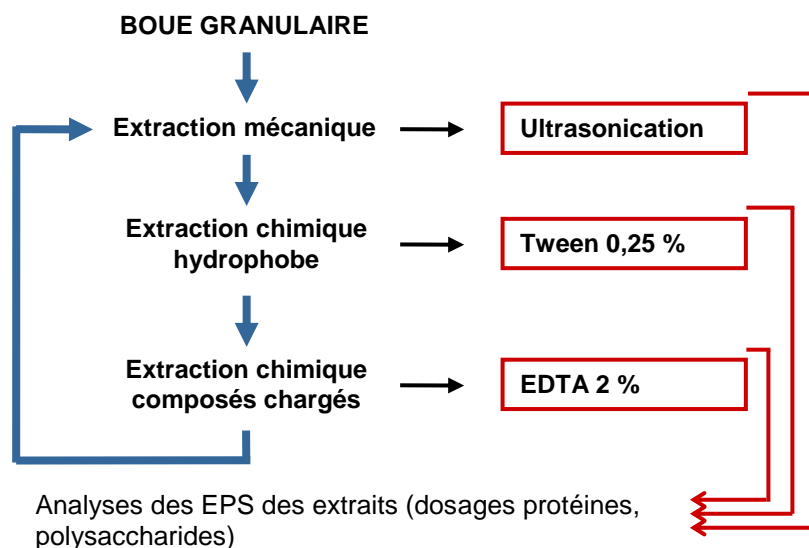


Figure 68 : protocole multiméthode d'extraction des EPS des agrégats bactériens.

Comme on le voit sur cette figure, ce protocole peut être répété plusieurs fois consécutives ce qui permet d'augmenter les quantités d'EPS extraites. Les résultats de ces dosages ainsi que la modélisation mathématique de la quantité d'EPS extraites à chaque séquence sont reportés dans la figure 69.

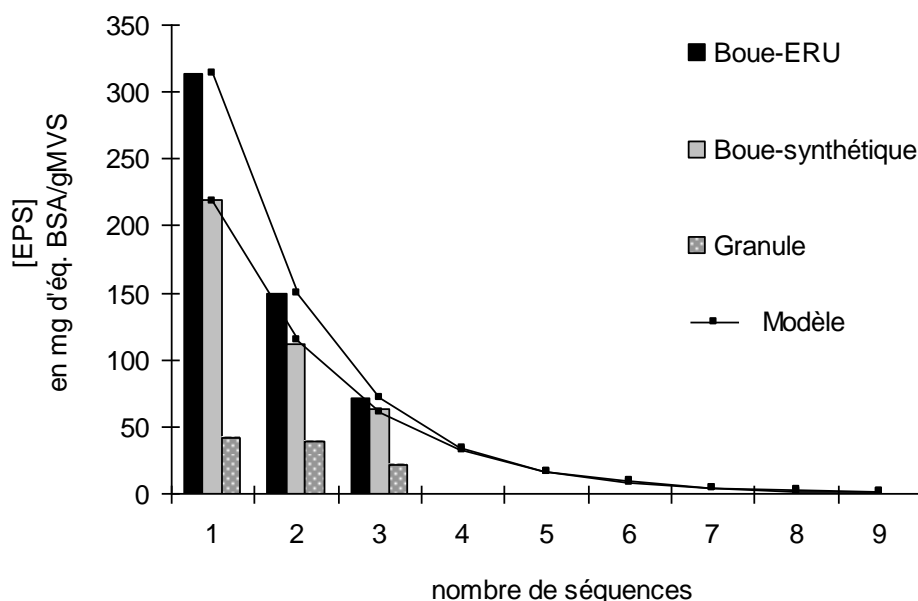


Figure 69 : Modélisation mathématique de la quantité d'EPS extraites. Les histogrammes représentent les EPS extraites par trois séquences successives du protocole de référence multi-méthodes (ultrasonication 2min, tween 0,25%, EDTA 2%) effectuées sur des boues alimentées par des eaux résiduaires urbaines (ERU), des boues alimentées par un effluent synthétique et des granules. (thèse Monique Ras, LBAE, 2008).

Table 10 : Comparaison des quantités d'EPS extraites lors des trois séquences d'extractions effectuées sur boues activées et granules par le protocole multi-méthodes de référence (thèse Monique Ras, LBAE, 2008).

	Boue ERU	Boue synthétique	Granule
Protéines	466 mg / g MVS	348 mg / g MVS	64 mg / g MVS
Polysaccharides	68 mg / g MVS	46 mg / g MVS	38 mg / g MVS
Total EPS	534 mg / g MVS	394 mg / g MVS	102 mg / g MVS
P/S	6,9	7,6	1,7

Dans des boues flocculantes alimentées par eaux résiduaires urbaines ou par effluents synthétiques, on remarque un épuisement progressif des quantités d'exopolymères extraits à chaque séquence. Cet épuisement suit une loi que l'on peut prédire précisément par une expression exponentielle décroissante:

$$EPS_n = EPS_1 \times A^{(n-1)}$$

EPS_n est la quantité d'EPS en mg / g de MVS extraites lors de la séquence d'extraction n, et A le taux de déstructuration. Dans le cas des boues flocculantes, ces taux de déstructuration sont tous proches de 0,5 et compris entre 0,45 et 0,53. Cela signifie d'après la formule, que les quantités extraites à l'étape « n+1 » sont deux fois plus faible que celles extraites à l'étape « n ».

En ce qui concerne l'extraction des EPS issues des granules, l'épuisement progressif des protéines et des polysaccharides n'est pas observé entre les séquences 1 et 2, et on observe uniquement une légère diminution de la quantité totale d'EPS à partir de la troisième séquence. Le modèle exponentiel précédent n'est pas applicable dans ce cas, ce qui laisse penser que l'extraction est trop partielle.

En outre, comme en témoigne la table 10, les quantités d'EPS effectivement extraites des granules après trois séquences sont beaucoup plus faibles que dans les cas des autres types d'agrégats. Les quantités de protéines ne sont que de 64 mg par g de MVS contre 466 et 348 mg par g de MVS pour, respectivement, les boues alimentées par eaux résiduaires urbaines ou par effluent synthétique. La baisse est moins importante mais toujours significative dans le cas des polysaccharides puisque seulement 38 mg de polysaccharides par g de MVS sont extraits des granules contre 68 et 46 dans les cas des boues flocculantes. Le rapport P/S est également très différent dans le cas des granules pour lesquels il est de 1,7 alors qu'il est de 6,9 et 7,6 pour les boues flocculantes.

Ces résultats sont probablement imputables à une extraction partielle des EPS due à la compacité beaucoup plus importante de la matrice d'EPS des granules (en comparaison avec celles des flocs et biofilms) qui rend difficile le détachement des polymères et sans doute également l'accès des tampons d'extraction aux parties internes des agrégats.

Cette étude préliminaire suggère donc que le protocole de référence, mis au point sur des flocs, n'est pas adapté à ce type d'agrégats et qu'il est nécessaire d'en intensifier les étapes afin d'augmenter son efficacité et obtenir des extraits de polymères représentatifs de l'ensemble des EPS des granules.

I.2. Effet de la sonication

Les ultrasons auxquels sont soumis les agrégats bactériens provoquent le détachement mécanique d'EPS. Ce détachement est aspécifique, il ne dépend pas d'un type particulier d'interaction chimique mais plutôt du degré de cohésion des molécules et éventuellement de leur localisation. En déstabilisant la structure globale du granule, le traitement mécanique peut également faciliter l'accès des tampons utilisés lors les étapes suivantes d'extraction chimique aux parties internes des agrégats et ainsi améliorer leur action. Pour cette raison, la chronologie des étapes du protocole d'extraction, étape mécanique en premier suivie des deux étapes chimiques, est conservée et on tentera d'intensifier la désintégration physique.

Afin d'accroître l'efficacité de ce traitement mécanique, la durée d'application des ultrasons est augmentée. Il est réalisé à l'aide d'une sonde HD 2200 (Bandelin Electronic) permettant d'augmenter la puissance de 37 à 120 W (augmentation de 224 %) pour des durées allant de 1 à 10 minutes ce qui permet de délivrer au maximum une puissance spécifique de 200 000 kJ / kg. En revanche, la fréquence de 20 kHz utilisée dans le protocole de référence est conservée. Comme montrée lors d'une étude précédente réalisée sur des boues flocculées cette puissance est a priori suffisamment limitée pour éviter les problèmes de lyse cellulaire (thèse de Julien Laurent (ENSIL Limoge, 2009)).

Cette étape est suivie des deux étapes chimiques : incubation 1h en PBS-Tween 0,25 % puis 1 h en Tris-EDTA 2 %. Cette séquence est répétée deux fois puis les EPS contenus dans ces extraits sont dosés. L'activité de la G6P-DH extracellulaire est également mesurée mais aucune activité n'est détectée, ce qui indique que peu ou pas de cellules ont été endommagées lors de l'extraction des EPS.

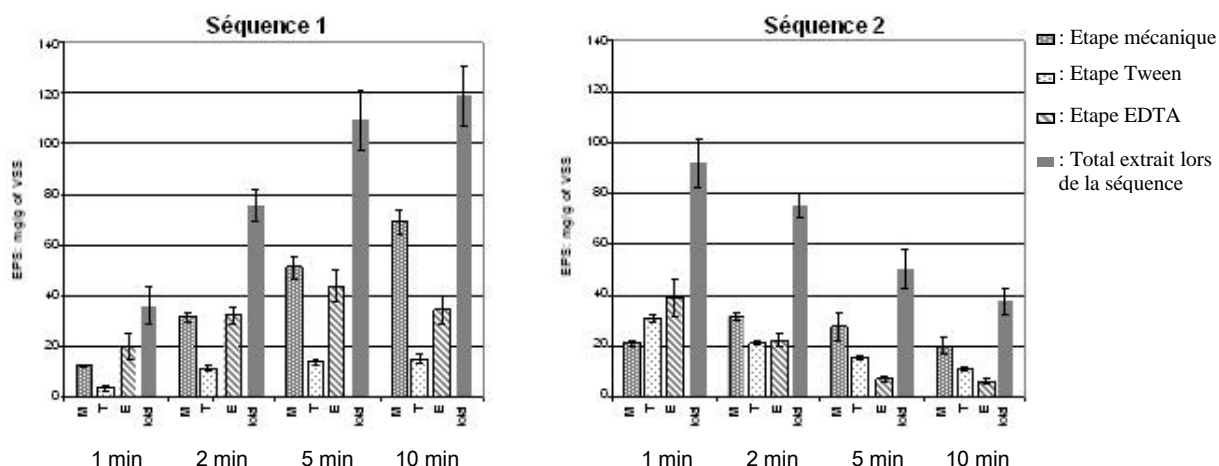


Figure 70 : EPS totaux extraites de granules par deux séquences successives du protocole multi-méthode. (M : mécaniques ; T : Tween 0,25 % ; E : EDTA 2 %). L'étape mécanique est un traitement aux ultrasons de différentes durées (1, 2, 5 et 10 min) effectuées en parallèle sur 4 échantillons distincts. Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des dosages effectués en triplicat.

Selon les résultats de ces expériences représentés sur la figure 70, cet accroissement de la durée du traitement permet l'augmentation des quantités d'EPS extraites pendant l'étape mécanique mais aussi durant les deux étapes chimiques de la première séquence. En effet, la quantité d'EPS extraites pendant ces étapes chimiques est plus importante après un traitement mécanique par ultrasons de 10 min que de 1 min. Cette augmentation est sans doute due à une amélioration de l'accès des composés chimiques (Tween et EDTA) au sein du granule consécutive au traitement par ultrasons.

La tendance inverse est observée lors de la seconde séquence d'extraction où les quantités d'EPS sont cette fois plus importantes avec les protocoles incluant 1 ou 2 min de traitement mécanique qu'avec ceux comportant des étapes ultrasons plus longues (5 et 10 min). Ceci est probablement dû à une diminution de la quantité d'EPS extractibles dans les agrégats lors de la séquence 2 d'autant plus importante que la première séquence d'extraction est efficace. Toutefois, on constate que les quantités totales d'EPS extraites sur l'ensemble des deux séquences varient peu. Elles sont en effet de 127 mg / g de MVS avec 1 min de sonication et de 160 mg / g de MVS avec 5 ou 10 min de sonication. Il semble donc que lorsque les quantités d'EPS quantités extraites sont faibles en séquence 1, elles sont compensées par de fortes extractions en séquence 2.

Si on compare des extractions effectuées avec une étape mécanique de 2 min à celles effectuées avec 10 min, on remarque que la répartition des EPS extraites au cours des trois étapes du protocole (mécanique, tween et EDTA) est beaucoup plus équilibrée avec 2 min de traitement. En effet, avec le traitement de 10 min, en particulier lors de la séquence 1, les EPS extraites lors du traitement mécanique sont largement majoritaires (58 %) au détriment des étapes tween et EDTA qui suivent. Pour une durée de traitement de 2 min, on constate que les quantités extraites lors de l'étape mécanique diminuent (35 %) et sont pratiquement équivalentes à celles obtenues lors de l'étape EDTA. Comme les étapes d'extraction chimiques sont plus spécifiques de certains types d'interactions (interactions ioniques dans le cas de l'EDTA qui est un chélateur de cations et interactions hydrophobes dans le cas du Tween qui est un détergent) les quantités élevées d'EPS extraites à ces moments là sont susceptibles de renseigner sur les propriétés chimiques des molécules extraites. Par conséquent, afin d'optimiser le fractionnement des EPS, une durée proche de 2 min sera privilégiée. Afin d'augmenter le rendement final en EPS extraites, ce protocole sera également répété plusieurs fois.

La figure 71 représente les résultats obtenus lors des extractions des EPS des granules en répétant ce protocole sur quatre séquences. Les EPS sont ensuite dosées et la figure 71 illustre la décroissance progressive des quantités d'EPS extraites à chaque étape.

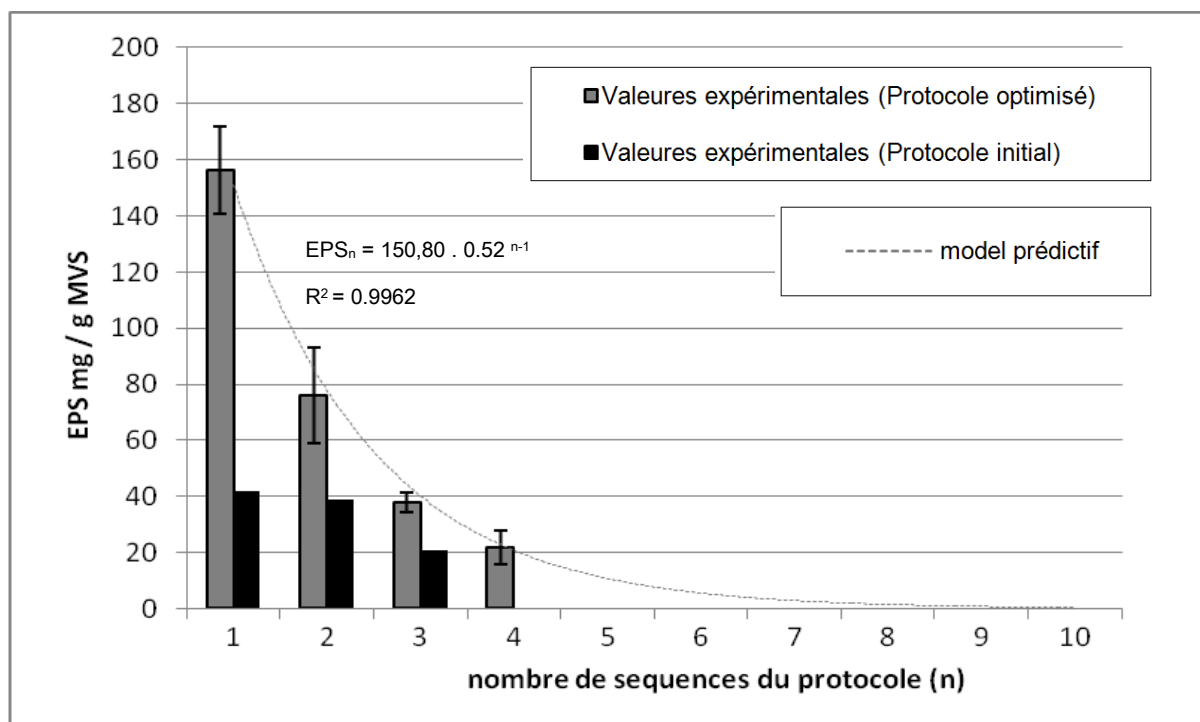


Figure 71 : Comparaison des efficacités des protocoles d'extractions optimisés et non optimisés appliqués à l'extraction des EPS de granules. Les histogrammes correspondent aux EPS extraites à chaque séquence successive du protocole où l'étape mécanique consiste en un traitement par ultrasons de 2 min à chaque séquence. La variation des EPS extraites en fonction du nombre de séquences successives est modélisée (valeurs théoriques). Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des résultats des deux extractions effectuées en parallèle et des dosages effectués en triplicat.

Comme dans le cas des floccs étudiés par Monique Ras (Ras et al., 2008a), cet épuisement réalisé expérimentalement sur 4 séquences successives, suit une loi exponentielle décroissante dont la formule est :

$$[\text{EPS}]_n = 150,80 \times 0,52^{n-1}$$

où n est le numéro de la séquence considérée.

Cette équation va permettre également de déterminer les quantités d'EPS qui auraient été extraites par des séquences additionnelles. D'après ces valeurs théoriques, la quantité totale des EPS extractibles des granules par ce protocole peut être considérée comme atteinte après la neuvième séquence. On en déduit que la quantité totale d'EPS extractibles par cette méthode est évaluée après 9 séquences, est de 311 mg.g⁻¹ de MVS. A la quatrième séquence d'extraction, 292 mg d'EPS par g de MVS sont extraits, soit 94 % de ces EPS extractibles.

Au cours de cette expérience aucune activité G6P-DH n'a été détectée dans les divers échantillons. D'après les dosages effectués, les 292 mg d'EPS par g de MVS se répartissent en 232 mg de protéines par g de MVS et 59 mg de polysaccharides par g de MVS (soit 80 % de protéines et 20 % de polysaccharides et un rapport PN / PS de 3,93). L'optimisation du protocole d'extraction a donc surtout permis d'augmenter significativement les quantités de protéines extraites (augmentation d'un facteur 3,4) par rapport aux quantités de polysaccharides (augmentation d'un facteur 1,6).

I.3. Effet d'un broyage aux billes de verre

Afin d'améliorer encore l'efficacité de la stratégie d'extraction, on remplace le traitement par ultrasons par un cassage par billes de verres de 1 mm de diamètre. Un tel traitement se différencie des ultrasons par la nature de la contrainte appliquée aux agrégats. Au lieu de provoquer une altération générale modérée de la structure de la matrice d'EPS, comme dans le cas d'une sonication, cette méthode va permettre le détachement de fragments entiers de granules facilitant d'autant plus l'accès des tampons d'extraction chimiques aux EPS. Chaque cassage aux billes de verre est effectué sur les granules pendant des temps variables de 10, 20 et 30 min. Les agrégats subissent ensuite les deux étapes d'extraction chimique au PBS Tween 0,25 % et au Tris EDTA 2 %.

Les dosages des EPS obtenus après 2 séquences consécutives du protocole (figure 72) montrent des efficacités globales d'extraction supérieures à l'emploi des ultrasons puisque dès la première séquence, 273 mg d'EPS / g de MVS sont extraits contre seulement 156 mg / g de MVS après 2 min de sonication (figure 5).

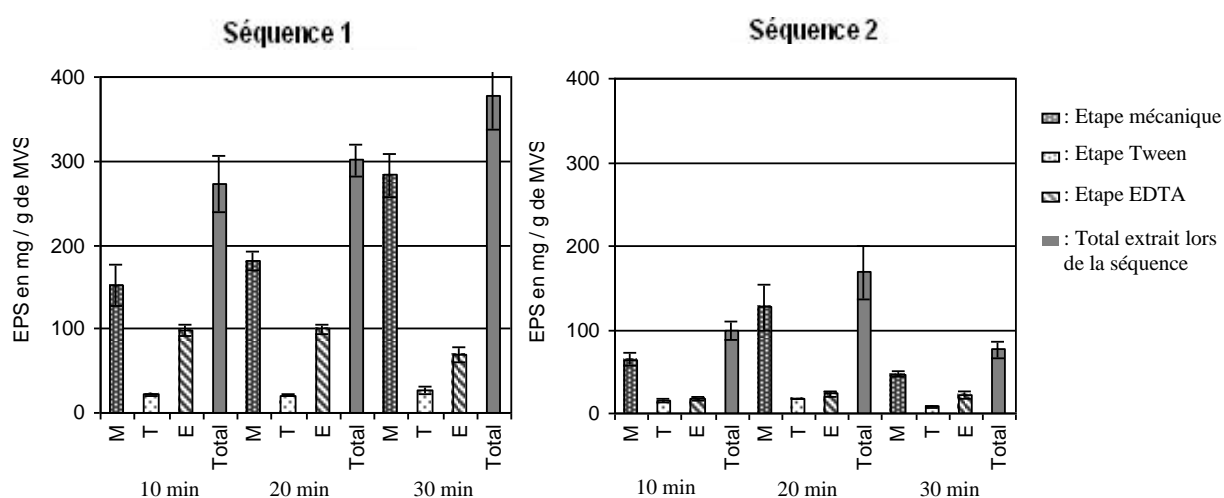


Figure 72 : EPS totaux extraites de granules par deux séquences successives du protocole multi-méthode utilisant les billes de verre. (M : mécaniques ; T : Tween 0,25 % ; E : EDTA 2 %). L'étape mécanique est un traitement par cassage aux billes de verres de 1 mm de diamètre pendant plusieurs durées (10, 20 et 30 min). Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des résultats des dosages effectués en triplicat.

Le phénomène d'épuisement semble lui aussi plus rapide. En effet, entre les séquences 1 et 2, on constate que les quantités d'EPS extraites avec un traitement par billes de verre diminuent de 63,7, 44,1, et 79,9 % respectivement. La répartition des EPS entre les trois étapes d'extraction est moins homogène qu'avec les traitements par sonication, les étapes mécaniques représentant à chaque fois plus de 58 % du total extrait sur les deux séquences. Par conséquent, le fractionnement des EPS en fonction du type d'interaction sera moins net qu'avec les ultrasons.

La mesure de l'activité G6P-DH révèle également un problème de lyse cellulaire lors des étapes mécaniques de 20 et 30 minutes dès la première séquence (figure 73). Ce n'est pas le cas des extraits ayant subi un traitement de 10 min.

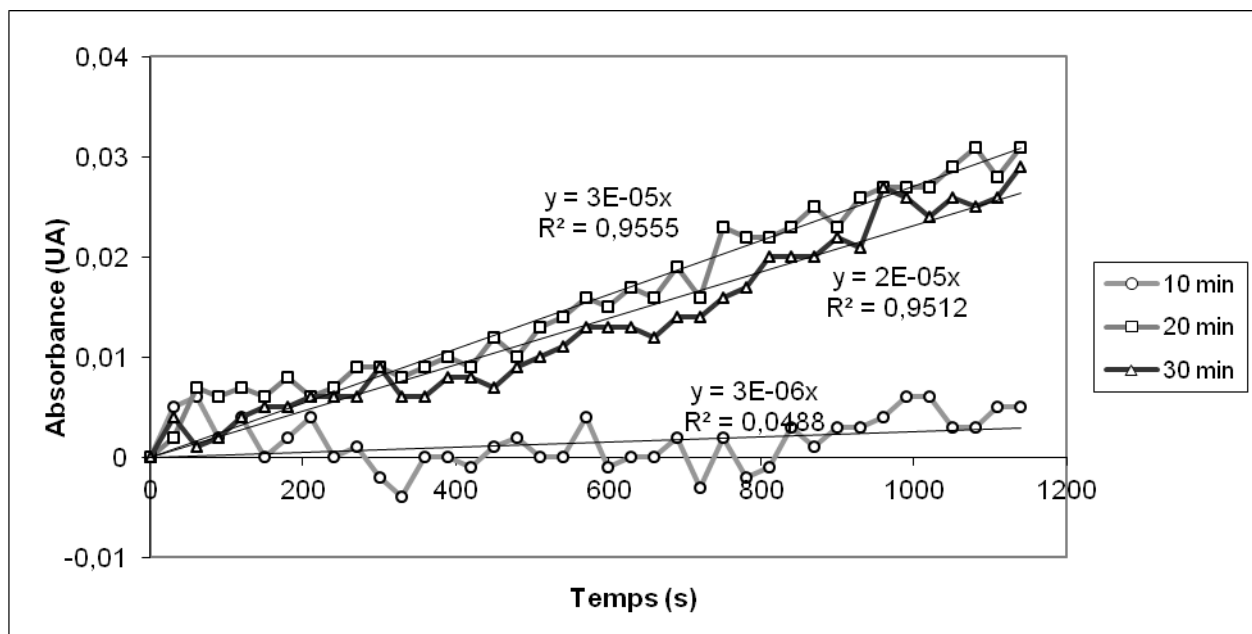


Figure 73 : Mesure de l'activité G6P-DH dans les solutions d'EPS extraites de granules par des traitements par les billes de verre de 10, 20 et 30 min.

Un temps de 10 minutes de vortex en présence de billes de verre apparait donc comme une technique d'extraction mécanique efficace et n'entraînant pas de lyse cellulaire. Comme précédemment, l'extraction a été prolongée sur au total quatre séquences successives. Les quantités d'EPS extraites à chaque séquence sont reportées sur la figure 74.

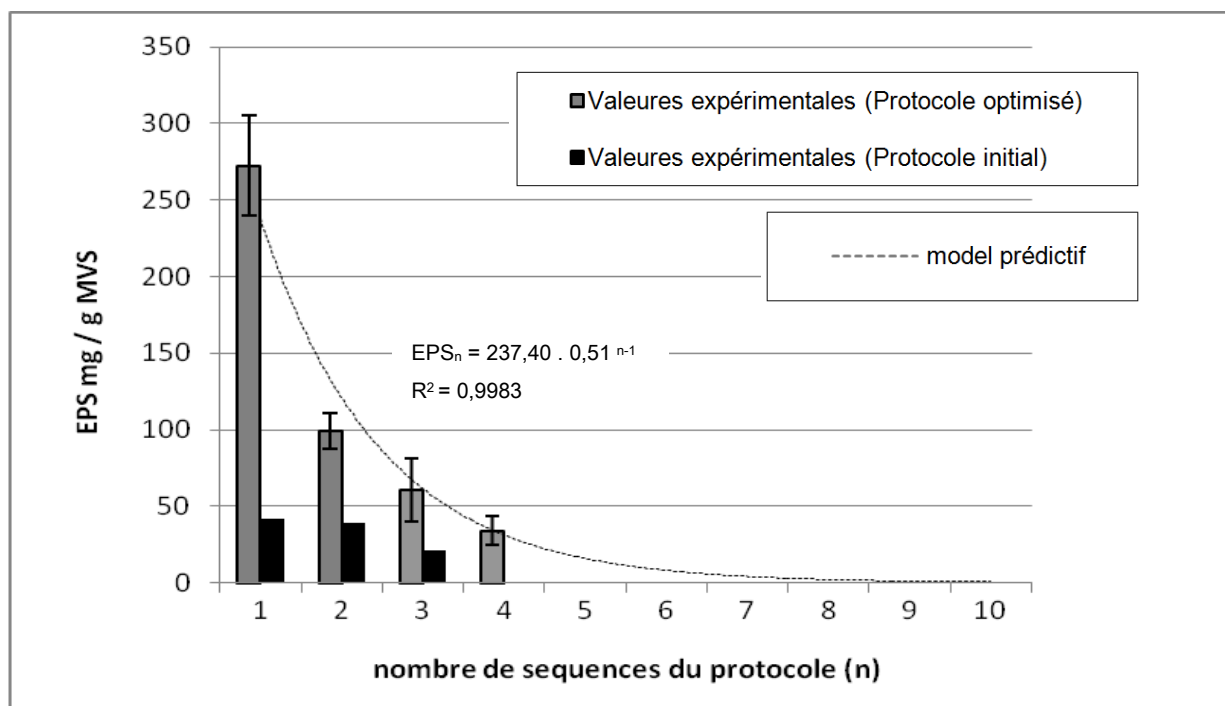


Figure 74 : Comparaison des efficacités du protocole d'extraction utilisant les billes de verre au protocole de référence appliqué à l'extraction des EPS de granules. Les histogrammes correspondent aux EPS extraites à chaque séquence successive du protocole. La variation des EPS extraites en fonction du nombre de séquences successives est modélisée (valeurs théoriques). Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des résultats des deux extractions effectuées en parallèle et des dosages effectués en triplicat.

En répétant quatre fois ce protocole, on parvient à extraire un total de 466 mg d'EPS par g de MVS. Cette décroissance suit une fois de plus une loi exponentielle décroissante de formule :

$$[\text{EPS}]_n = 237,4 \times 0,51^{n-1}$$

On s'aperçoit que le coefficient de déstructuration est ici de 0,51 contre 0,52 dans le cas des ultrasons. Selon cette équation, la quantité totale d'EPS extractibles des granules par cette méthode est de 482 mg d'EPS par g de MVS, quantité correspondant à 9 séquences d'extraction car on considère qu'à ce stade, les EPS extractibles par cette méthode sont complètement épuisées. Les EPS extraites au bout de quatre cycles correspondent à 96 % de ce total théorique. Toutefois, on constate que le modèle exponentiel correspond beaucoup moins à la réalité que dans le cas des ultrasons, les valeurs mesurées lors des 2 premières séquences d'extraction étant éloignées des valeurs théoriques.

Les EPS extraites de ces granules après quatre séquences se répartissent en 413 mg de protéines par g de MVS et 53 mg de polysaccharides par g de MVS (soit 89 % de protéines pour 11 % de polysaccharides, et un ratio PN/PS de 7,7). Ces éléments confirment bien les observations effectuées lors des extractions utilisant les ultrasons. Les protéines apparaissent toujours comme étant le composé majoritaire de la matrice d'EPS, et le ratio PN/PS, se rapproche fortement de ceux observés lors des extractions d'EPS de floes de boues activées (mesurés à 6,9 et 7,6 lors de nos études préliminaires).

I.4. Protocole retenu

Deux méthodes d'extraction des EPS des granules basées sur l'emploi d'un protocole multi-méthodes alternant successivement des étapes d'extraction mécaniques et chimiques ont donc été retenues. Ces méthodes se distinguent par la nature du traitement mécanique appliqué en première étape : des ultrasons sont appliqués à faible fréquence et pendant un temps court de 2 min au cours du protocole 1, alors que le protocole 2 inclut un traitement par agitation avec des billes de verre pendant 10 min.

Tout d'abord, dans les deux cas, on constate que l'optimisation a permis d'extraire beaucoup plus efficacement les EPS que la méthode initiale. En effet, les protocoles 1 et 2 ont permis d'augmenter respectivement de 164 et 323 % les quantités extraites en 3 séquence. On peut supposer à partir de là une bien meilleure représentativité des EPS extraites. D'ailleurs, ces protocoles ont également permis de passer d'un rapport PN / PS de 1,7 à 3,9 pour le protocole 1 et 7,7 pour le protocole 2, beaucoup plus cohérent avec les marquages d'EPS qui montrent une matrice protéique importante.

On remarque dans la table 2, que c'est le second protocole, utilisant les billes de verres qui permet l'extraction de la quantité la plus importante d'EPS après une séquence (294 mg/gMVS contre 151 mg/gMVS avec le protocole 1) ou après quatre séquences (465 mg/gMVS contre 292 mg/gMVS avec le protocole 1).

La quantité totale d'EPS extractibles des granules n'est également pas la même selon le protocole choisi. Une valeur de 482 mg/g de MVS est théoriquement extractible si on utilise le protocole 2 alors que cette valeur est de 311 mg/g de MVS avec le protocole 1. Celle-ci paraît en effet dépendre de la puissance du protocole d'extraction.

Table 11 : Analyse des efficacités d'extraction des EPS des granules par les protocoles optimisés utilisant les ultrasons (protocole 1) et les billes de verre (protocole 2) au bout de 4 séquences d'extraction (EPS₄ (exp)) et selon les calculs théoriques (EPS extractibles), A étant le coefficient d'épuisement déduit de ces calculs. Et évaluation de la capacité de fractionnement de ces protocoles entre les étapes chimiques mesurée à l'étape 1 et 2 (EPS₁ (exp) et EPS₂ (exp)).

	EPS ₁ (exp)*			EPS ₂ (exp)*			EPS ₄ (exp)* mg/g	EPS extractibles mg/g	A
	Total mg/g	EDTA (%)	Tween (%)	Total mg/g	EDTA (%)	Tween (%)			
Protocole 1 (US, 2 min)	156 ± 16	47 %	8 %	232 ± 28	38 %	9%	292 ± 37	311	0,52
Protocole 2 (billes, 10 min)	273 ± 32	36 %	8 %	372 ± 45	31 %	10 %	466 ± 75	482	0,51

*EPS_n(exp) : EPS extraites à l'étape n du protocole multi-méthodes

Cependant, de part sa plus grande modération, le protocole 1 permet un fractionnement un peu plus important des EPS par les étapes chimiques. En effet, dans le cas du protocole 1, comme on le voit dans le tableau 11, au cours de la séquence 1, 47 % des EPS sont extraites par le traitement à l'EDTA contre seulement 36 % si on utilise le protocole 2. De même et au cours de la séquence 2, 38 % des EPS sont extraits par le traitement à l'EDTA avec le protocole 1 contre seulement 31 % si on utilise le protocole 2.

L'emploi du protocole 2 permet donc la récupération d'une quantité plus importante d'EPS et donc potentiellement plus représentative du contenu réel du granule, le protocole 1 permet une séparation plus importante des EPS selon les étapes d'extraction, et notamment selon les étapes chimiques. Ceci peut renseigner dans une certaine mesure sur les propriétés et les fonctions de ces EPS au sein de l'agrégat. Par conséquent, pour les études suivantes, nous utiliserons exclusivement les données et échantillons issus du protocole 1 utilisant les ultrasons lors de l'étape mécanique.

II. Fractionnement et caractérisation biochimique des EPS extraites des granules

Comme nous l'avons vu dans la partie étude bibliographique, la cohésion des granules repose sur des interactions chimiques qui vont relier les différents EPS et les cellules du granule. Les différentes étapes de notre protocole multi-méthodes ont pour but de déstabiliser une catégorie particulière de ces interactions. Par conséquent, la répartition, au cours de l'extraction, des quantités d'EPS extraites entre ces trois étapes va nous informer sur les importances relatives de ces différents types de molécules et/ou d'interactions au sein des agrégats granulaires. Nous avons donc analysé la répartition des différents types d'EPS (protéines, polysaccharides, acides uroniques) entre les différentes étapes d'extraction (US, Tween, EDTA) réalisées avec le protocole d'extraction utilisant les ultrasons.

II.1. Fractionnement lié aux méthodes d'extraction

La figure 75 représente les données de répartition des différentes EPS entre les 3 étapes d'extraction obtenues dans le cas du protocole optimisé utilisant les ultrasons. Tout d'abord on constate que l'extraction des protéines, globalement majoritaire (79,5 %), nécessite chacune des trois étapes : 47 % de ces polymères sont extraits durant les étapes mécaniques, 10 % pour l'étape Tween et 43 % lors du traitement à l'EDTA. Ceci est en accord avec la nature chimique complexe de ces polymères caractérisés par la présence d'acides aminés ioniques, hydrophobes ou neutres sur la chaîne polypeptidique.

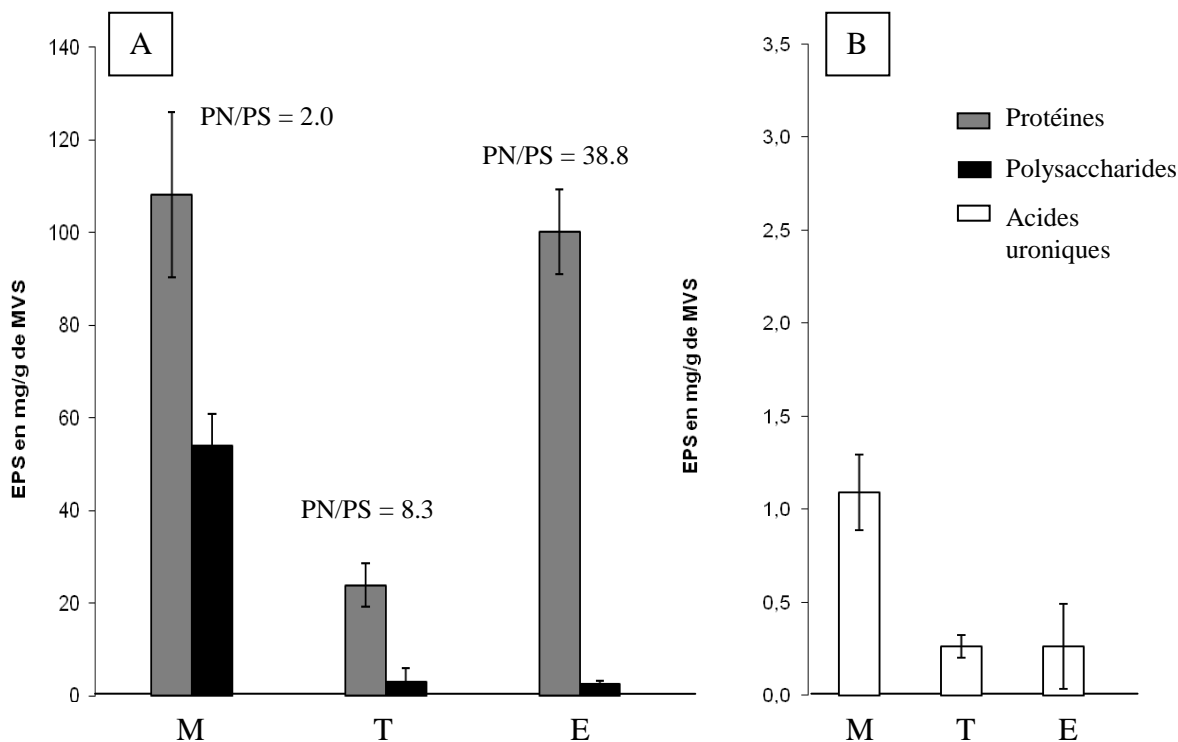


Figure 75 : Distribution des différents types d'EPS entre les étapes d'extractions. Quantités totales des protéines (figure 75.A), polysaccharides (figure 8.A) et acides uroniques (figure 75.B) extraits par quatre séquences successives du protocole multi-méthodes optimisé. (M : mécanique , 2min aux ultrasons, T : tween 0,25 % et E : EDTA 2 %). Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des résultats des deux extractions effectuées en parallèle et des dosages effectués en triplicat.

Les Polysaccharides, en revanche, sont extraits préférentiellement au cours de l'étape mécanique (94,2 %). Il est intéressant de noter que très peu de ces polymères ont été détectés dans les EPS extraites par le tampon tween, ce qui confirme la nature hydrophile des polysaccharides.

On note également que les acides uroniques sont extraits principalement lors des extractions par les ultrasons (67 %). Compte-tenu de leur caractère anionique, on aurait pu s'attendre à une efficacité d'extraction plus importante après chélation de cations par l'EDTA.

L'analyse globale des résultats de la figure 75 permet de déduire que 55,6 % du total des EPS sont extraites durant le traitement mécanique, 9,2 % au cours de l'étape au Tween et 35,2 % au cours de celle à l'EDTA. Ces résultats soulignent l'importance des interactions ioniques au sein de la matrice des granules. Ils sont en accord avec l'extraction quantitative des EPS de floccs ou granules décrite par d'autres auteurs après action de résines cationiques (Sobeck and Higgins (2002), Wilén et al., (2003)). Enfin, l'analyse de la distribution en termes de ratio PN / PS indique que ce paramètre est clairement influencé par la sélectivité de la méthode d'extraction. En effet, un faible ratio de 2 est attribué au premier traitement, le traitement mécanique, tandis qu'une valeur très élevée de 38,8 a été calculée pour les extraits EDTA et une valeur intermédiaire de 8,3 pour les extraits de Tween. Le rapport PN / PS calculé sur l'ensemble des EPS récupérés dans tous les extraits après 4 séquences successives, est quant à lui de 3,6.

Sur la figure 76, la contribution relative de chaque méthode à l'efficacité d'extraction globale des EPS est comparée pour les boues granulaires soumis au protocole optimisé et pour les boues floculantes soumises au protocole initial lors de trois séquences consécutives. Dans ce cadre, les boues cultivées en SBR, constituent une forme intermédiaire entre les boues floculantes et granulaires. En effet, il s'agit de boues floculantes cultivées pour une courte période dans les conditions d'obtention des granules et qui présentent une légère densification. Cette figure 9 montre les distributions observées d'EPS pour les différents échantillons analysés. Les EPS extraites à partir de la boue ERU sont distribuées à 42,5 % dans les extraits soniqués, 27 % dans les extraits de Tween et 30,5 % dans les extraits de l'EDTA. Les EPS extraites à partir de la boue synthétique étaient également distribuées, avec 45,8 % après ultrasons, 27,5 % dans le Tween et 26,7 % dans les extraits EDTA.

Dans le cas de granules, le profil de distribution des EPS entre les 3 types d'extraits est sensiblement différent de celui obtenu avec les EPS extraites des boues floculées. En effet, le rendement de l'étape Tween diminue radicalement à 9,2 % au profit de l'EDTA dont les étapes représentent 37,5 % des EPS extraites. Les EPS extraites lors des étapes ultrasons représentent quant à elles 54,3 % du total.

Les boues cultivées en SBR montrent un profil intermédiaire. En effet, l'étape Tween marque une très légère diminution en passant à 22,7 % et l'étape US augmente jusqu'à 49,2 %. En revanche, l'augmentation de l'importance de l'étape EDTA n'est pas encore observable à ce stade, puisque la part de cette étape n'atteint que 28,1 %.

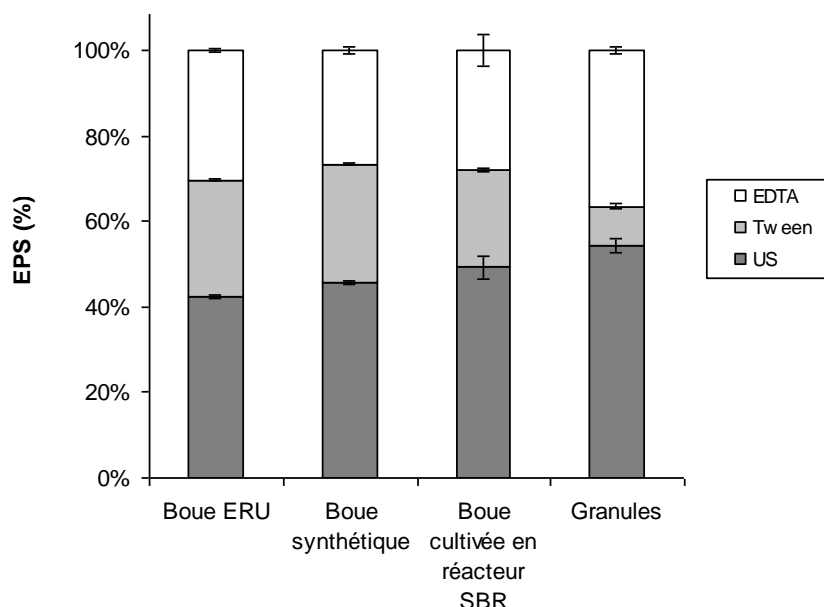


Figure 76 : Répartition des EPS extraites par les étapes US, Tween et EDTA selon l'origine des matrices biologiques. Mesures effectuées après trois séquences consécutives du protocole multi-méthodes initial pour les boues « ERU » et « synthétique », ainsi que pour la boue cultivée en réacteur SBR, et optimisés pour les boues granulaires. Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des dosages réalisés en triple. Ces données soulignent la capacité de la procédure multi-méthode à fournir différentes distributions d'EPS selon l'origine des agrégats étudiés. Par ailleurs, la proportion plus élevée des EPS extraites par l'EDTA dans les granules suggère l'implication de cations divalents dans l'attachement de certains EPS à la matrice. Cette hypothèse est renforcée par l'évolution du profil d'extraction lors du passage d'une boue floculante à une boue granulaire.

II.2. Fractionnement lié à la répétition des séquences d'extraction successives

La plus ou moins grande facilité avec laquelle les EPS de différentes natures sont extraites est fonction de la force d'attachement de ces EPS à la matrice du granule. On peut donc utiliser le fractionnement en séquences successives des EPS extraites pour estimer la force d'attachement des polymères. Dans ce but, la figure 77 compare la capacité du protocole optimisé à extraire les différents types de polymères (protéines, polysaccharides, acides uroniques) à chaque séquence réalisée.

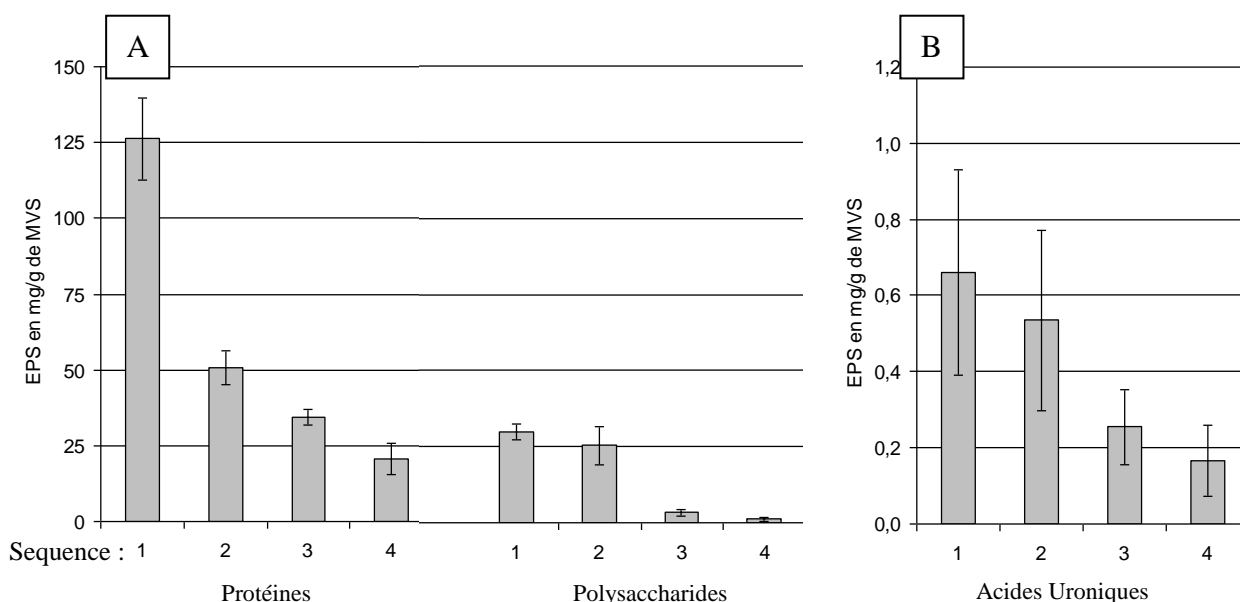


Figure 77 : Distribution des différents types d'EPS extraites le protocole multi-méthodes optimisé entre les quatre séquences successives effectuées. Les barres d'erreurs systématiques sont calculées à partir des résultats des deux extractions effectuées en parallèle et des dosages effectués en triplicat.

Les polysaccharides sont extraits relativement facilement car 92,6 % d'entre eux sont récupérés lors des deux premières séquences et uniquement 7,4 % durant les séquences 3 et 4. Or, les polysaccharides étant extraits quasiment intégralement par la sonication (à 94,2 % selon la figure 8), on peut même déduire que ces polymères sont extraits presque entièrement par les deux premières étapes US du protocole multiméthode. Les protéines sont également extraites préférentiellement durant les séquences 1 et 2 mais 23,8 % de ces polymères sont encore récupérés lors des séquences 3 et 4. Enfin, l'extraction des acides uroniques apparaît plus difficile que celle des polysaccharides totaux car on observe leur épuisement régulier à chaque séquence, ce qui peut suggérer un enchevêtrement plus important des polysaccharides anioniques que des polysaccharides neutres avec les autres EPS de la matrice.

A partir de ces observations, on peut donc émettre des hypothèses sur la capacité d'adhésion des différents types d'EPS présents dans le granule. En effet, selon ces résultats, on peut supposer que la capacité d'adhésion des polysaccharides est en règle générale plus faible que celle des protéines et des acides uroniques qui sont extraits plus progressivement au cours du protocole.

III. Analyse de la diversité moléculaire des EPS du granule par chromatographie

III.1. Analyse des EPS par chromatographie d'exclusion stérique

III.1.1. Distribution en taille des EPS totaux

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique des EPS extraites nous permettra de connaître l'intervalle de tailles des EPS, et également d'avoir une idée de la diversité moléculaire des composants des granules. Dans un premier temps, cette analyse a été effectuée sur le mélange des EPS extraites par les 3 méthodes du protocole d'extraction optimisé. Nous avons comparé les profils chromatographiques des extraits obtenus lors de la première et la troisième séquence du protocole.

La colonne utilisée dans ce cas est une colonne Protein K 804 qui va séparer les molécules sur une large gamme de tailles s'échelonnant entre 1000 et 1 000 000 Da. Les masses moléculaires sont déterminées grâce à un étalonnage effectué à partir de protéines de tailles connues (partie Matériels et Méthodes). L'absorbance est suivie à 280 nm. Cette longueur d'onde permet la détection des protéines ainsi que des acides nucléiques et des substances humiques. Cependant, comme dit précédemment, la matrice des granules étudiés est composée quasiment entièrement de polysaccharides et de protéines. Par conséquent, on pourra considérer que seules les molécules de nature protéique, majoritaires dans les granules étudiés, sont détectés par cette méthode..

Cinq groupes de molécules sont identifiés dans les profils chromatographiques en fonction des poids moléculaires des molécules éluées: (i) molécules éluées dans le volume d'exclusion total de la colonne (6 ml) et de taille supérieure à 1000 kDa), (ii) molécules de haut poids moléculaire éluées entre 7,2 et 9,4 mL et composées par des molécules de taille comprise entre 1 000 et 150 kDa, (iii) molécules de taille intermédiaire éluées entre 9,4 et 11,7 ml, et de taille comprise entre 150 et 6 kDa, (iv) molécules de petite taille éluées entre 11,7 et 13,1 ml et d'un poids moléculaire de 6 à 1 kDa, (v) molécules éluées après 13 mL, avec la taille inférieure à 1 kDa, mais n'étant pas incluse dans la gamme de séparation optimale de la colonne.

La figure 78 représente le résultat de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique de l'ensemble des EPS extraits au cours des trois étapes (ultrasonication, tween et EDTA) de la séquence 1 et de la séquence 3 du protocole optimisé.

La comparaison de ces deux profils nous montre que les mêmes gammes de tailles de molécules sont obtenues durant les séquences 1 et 3. Bien qu'il soit difficile d'interpréter précisément le chromatogramme obtenu pour la troisième séquence à cause de la faiblesse du signal obtenu, il est possible de dégager quelques informations de la comparaison entre les deux séquences. En particulier, on note que les deux empreintes chromatographiques, correspondant aux deux séquences, sont similaires, celle de la séquence 3 étant simplement atténuée par rapport à la séquence 1.

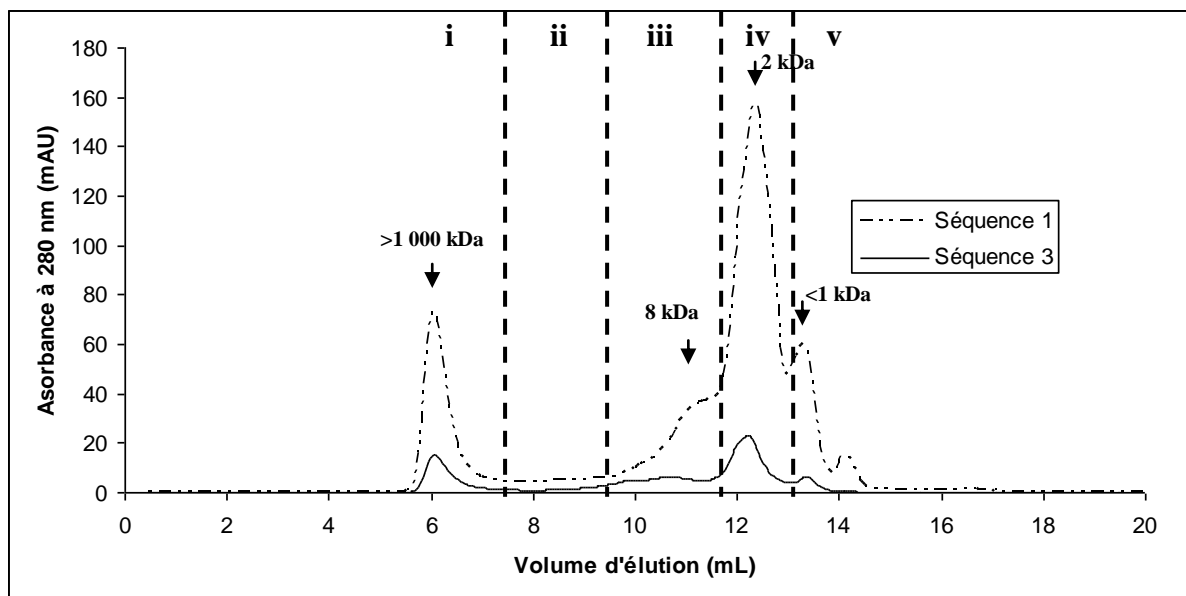


Figure 78 : Profils chromatographiques sur colonne de gel filtration Protein K 804 des tailles d'EPS protéiques extraites lors des séquences 1 et 3 du protocole d'extraction multi-méthodes. Les quantités de protéines sont mesurées par absorbance à 280 nm. Les échantillons déposés sont composés des extraits US/Tween/ EDTA : 1volume/ 1volume/ 1volume.

On retrouve également des pics dans le groupe i correspondant aux tailles supérieures à 1000 kDa. Ce sont des composés trop volumineux pour entrer dans matrice poreuse de la phase solide de la colonne et qui passent donc dans le volume d'exclusion totale. Etant donnée la taille importante des particules correspondant à ce pic il est probable que celles-ci ne soient pas une seule molécule mais un ensemble d'EPS agrégées et de tailles plus réduites.

On remarque également un pic correspondant aux molécules du groupe iv, et un dernier pour des molécules de tailles inférieures à 1 kDa. Les molécules du groupe iv, dont les tailles sont situées entre 1000 et 6000 Da et représentent 16,2 % de l'aire totale à la séquence 1 et 23,9 % à la séquence 3. Elles constituent le groupe majoritaire de l'ensemble des molécules détectées. Un pic majoritaire correspondant à des tailles d'environ 2000 Da apparaît dans ce groupe. Il est possible qu'il s'agisse d'une espèce protéique en particulier, très fortement représentée dans la matrice d'EPS.

Si on compare les aires des pics des molécules séparées, on remarque que, entre les étapes 1 et 3, les quantités des molécules visualisées dans les groupes i, iii et iv, ont diminué d'un facteur de 5 à 8. Les molécules du groupe v, quant à elles, se sont épuisées d'un facteur 14. Cet épuisement plus intense peut être expliqué par un attachement moins fort de ces polymères à la matrice du granule. Ceci pourrait être imputable à la taille réduite des ces molécules inférieure à 1000 D, soit moins d'une dizaine d'acides aminés, qui va limiter les phénomènes d'entrelacement.

Un épaulement vers 8 kDa est visible en séquence 1 mais non détecté sur le chromatogramme de la séquence 3. Cependant, cette disparition peut aussi être imputable à la faiblesse du signal dans les mesures effectuées sur cette séquence.

Les empreintes de taille obtenues montrent globalement peu de molécules du groupe ii, de tailles comprises entre 150 et 1000 kDa. Ce sont surtout des molécules de poids moléculaire inférieur à 100 kDa (groupes iii, iv et v), ou agrégées (groupe i) qui sont visualisées. Ce type d'emprunte est donc très global, et un second passage sur des colonnes de filtration plus résolutive serait nécessaire pour appréhender la diversité des EPS extraites. Toutefois, la comparaison des profils des séquences 1 et 3 confirme l'épuisement des protéines observé lors du dosage des EPS extraites au cours de ce protocole.

Enfin, cette expérience a permis de mettre en évidence une fraction colloïdale éluée dans le volume d'exclusion totale. Cette fraction constitue 17,5 % des molécules de la séquence 1 et 16,5 % des molécules de la séquence 3. Cette tendance à se regrouper et à former des colloïdes en solution est sans doute liée à des propriétés cohésives importantes.

III.1.2. Distribution en tailles des EPS des différents extraits

Afin d'augmenter la résolution et la représentativité de certains EPS qui pourraient être extraites préférentiellement lors d'une étape spécifique, ces mêmes analyses ont été effectuées sur les extraits US, Tween et EDTA de la séquence 1. Les extraits de la séquence 3 sont ici abandonnés car les faibles quantités de molécules qu'ils contiennent ne permettent pas d'obtenir des chromatogrammes suffisamment informatifs.

Les résultats de cette séparation sont représentés sur la figure 79.

Le profil des extraits de sonication (figure 79.A) est très proche du profil global de la séquence (figure 78). Les cinq groupes de taille y sont représentés à l'exception du groupe ii. Le groupe iv est le plus représenté et inclus le pic majoritaire de la séquence d'une taille proche de 2 kDa (mesuré à 1,7 kDa ici) mais aussi un pic élué à 4 kDa qui n'était pas visible sur le profil global (figure 78). On voit également l'apparition d'un autre pic dans le groupe iii. Celui-ci est très mal séparé des autres molécules et présente un épaulement vers 20 kDa. Toutefois, l'étalement de ce pic sur l'ensemble de la zone iii et une partie de la zone ii suggère la présence de molécules de haut poids moléculaires (100 à 200 kDa). Le groupe i des EPS colloïdaux est également fortement représenté.

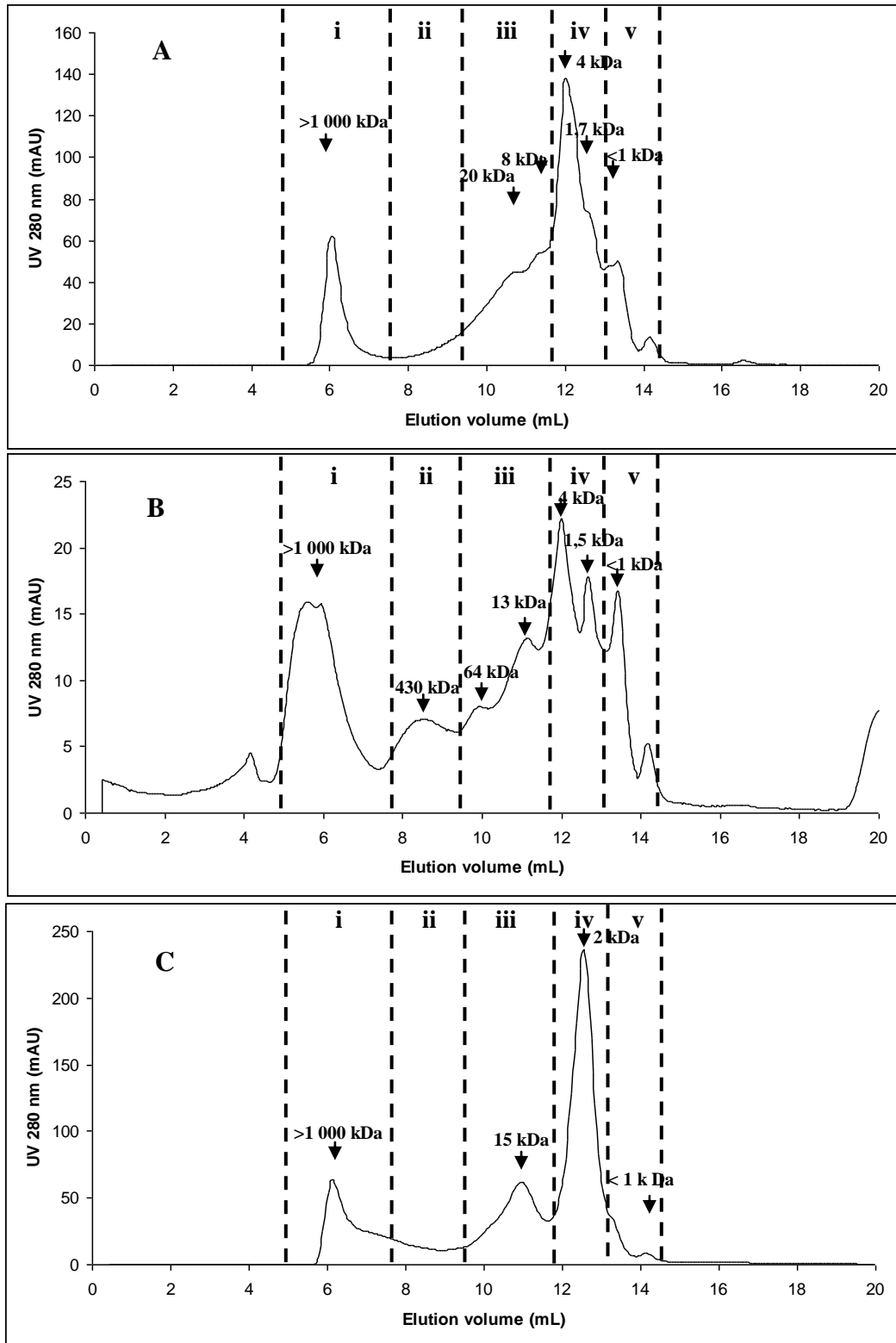


Figure 79 : Profils chromatographiques sur colonne de gel filtration Protein K 804 des tailles d'EPS protéiques extraites lors des trois étapes de la séquence 1 du protocole d'extraction multi-méthodes. Les quantités de protéines sont mesurées par absorbance à 280 nm. Etapes mécaniques (sonication) : A et chimiques : Tween : B et EDTA : C.

Le profil obtenu pour l'extrait de l'étape Tween (figure 79.B) est différent du profil global (figure 78) dans la mesure où il présente une plus grande diversité d'EPS. De la même façon que pour le profil global et le profil de sonication (figures 78 et 79.A.), les EPS colloïdaux apparaissent en groupe i mais sont cette fois majoritaires. On distingue également les deux pics importants à 4 et 1,5 kDa qui

apparaissaient en groupe iv dans l'extrait de l'étape mécanique. Les molécules du groupe v, de petites tailles, sont également visibles et représentées en plus forte proportion que sur la profil de sonication. Cependant, de nouvelles molécules, correspondant à des tailles plus importantes apparaissent dans les clusters ii, et iii. On observe, en effet, sur ce chromatogramme des composés de tailles centrées sur 430 kDa, 64 kDa et 13 kDa (figure 79.B).

Ces extractions par le tween permettent donc de mettre en évidence une diversité moléculaire importante des EPS protéiques qui n'apparaissait pas lors de l'analyse de l'extrait global ni celle des étapes mécaniques. Ces disparités observées entre les profils de chromatographie des étapes tween et ultrasonication peuvent avoir pour origine une différence dans la capacité des molécules extraites à adhérer au granule, ou une différence dans le caractère hydrophobe.

La comparaison de l'intensité des signaux à 280 nm indique clairement que les EPS extraites à cette étape sont quantitativement plus importants que les molécules extraites aux autres étapes. Ceci est en accord avec les données de dosage des protéines extraites des granules et notamment avec la figure 8, et confirme la prévalence des EPS extraites préférentiellement par l'étape EDTA lors de la procédure multi-méthode.

III.2. Etude de la charge négative nette des EPS protéiques par chromatographie d'échange d'anions

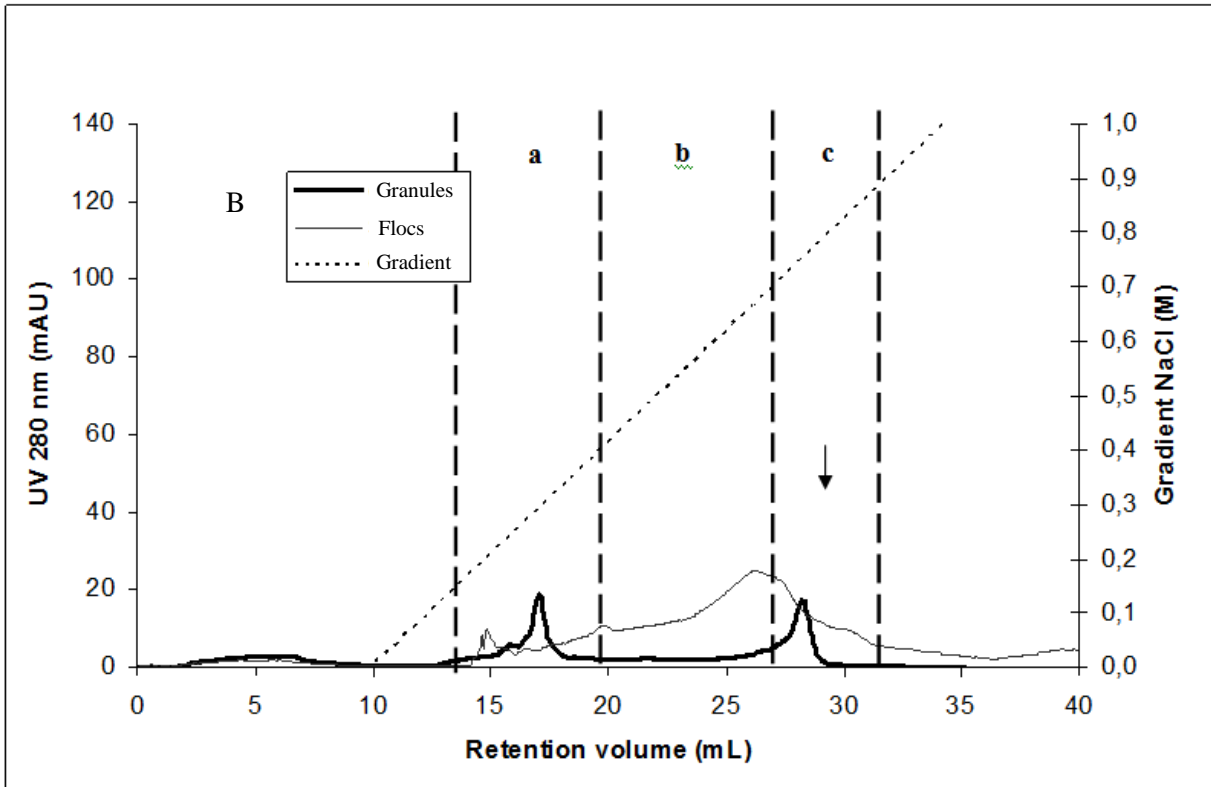
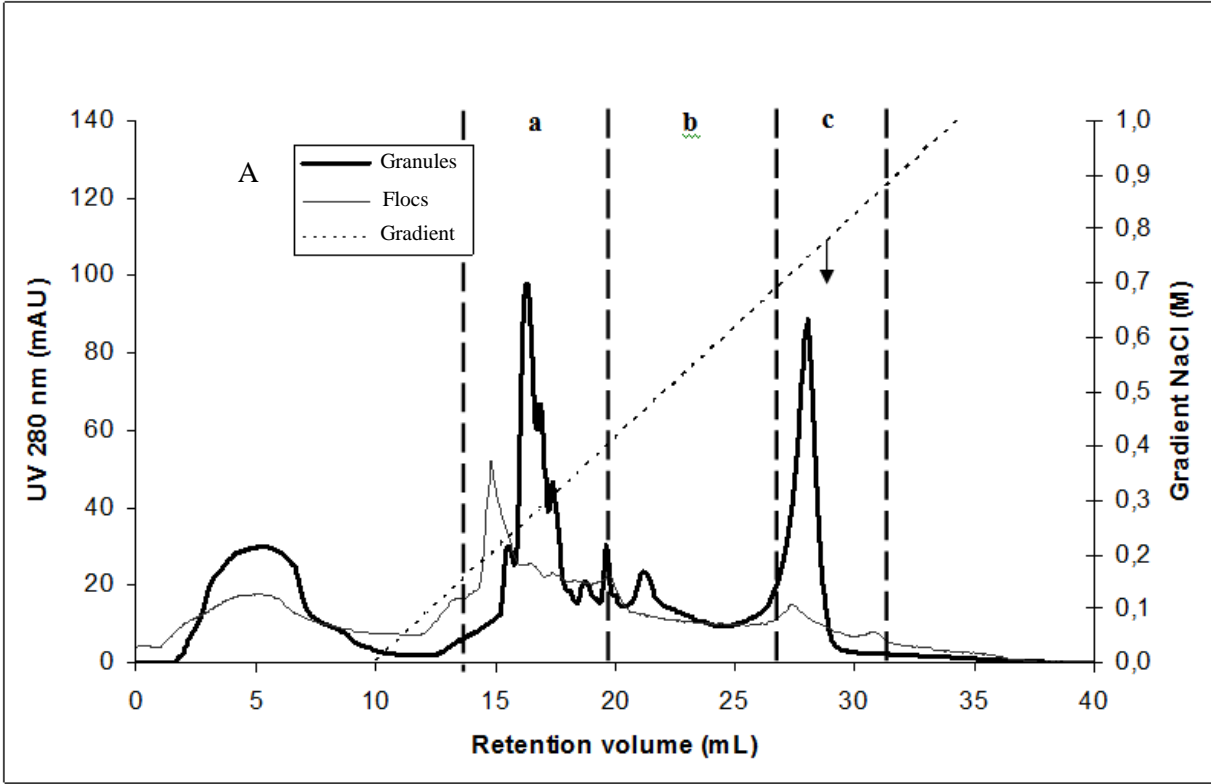
Le fractionnement des EPS extraites, en fonction des étapes d'extraction (US, Tween, EDTA), a mis en évidence un rôle potentiel des interactions ioniques et du pontage par des cations divalents dans la matrice d'EPS du granule. Ces interactions nécessitent la présence au sein des molécules concernées, de groupements chimiques chargés négativement.

Nous avons donc analysé les EPS extraites des granules par chromatographie d'échange d'anions afin de séparer les protéines en fonction de leur charge anionique. Une analyse similaire a été effectuée sur des EPS extraites de floccs d'une boue activée cultivée en pilote agité et alimentée par des eaux résiduaires urbaines.

Il est en effet intéressant de comparer la proportion de charges anioniques des EPS des granules à celles des EPS extraites de boues flocculantes car la présence de ces charges négatives pourrait être liée à la densification des granules.

Avant injection les extraits d'EPS sont dialysés contre un tampon Tris 5 mM pH 8 et la colonne est équilibrée par une phase mobile correspondant à ce même tampon. Dans ces conditions, toutes les protéines ayant un pH isoélectrique inférieur à 8 seront chargées négativement et donc susceptibles d'être retenues sur la colonne. Les protéines non retenues par la matrice cationique sont alors considérées comme chargées positivement ou neutre. Cette valeur de pH est choisie en accord avec celle fixée lors de la culture des granules en réacteur SBR (pH entre 7,2 et 9,2) afin d'analyser les propriétés anioniques des EPS dans les conditions de formation des granules. Les molécules adsorbées sont ensuite éluées par ordre croissant de leur charge négative globale en augmentant progressivement la concentration en NaCl de la phase mobile de 0 à 1 M.

Les résultats de ces analyses effectuées sur chacun des extraits US, Tween et EDTA sont représentés en figure 80.



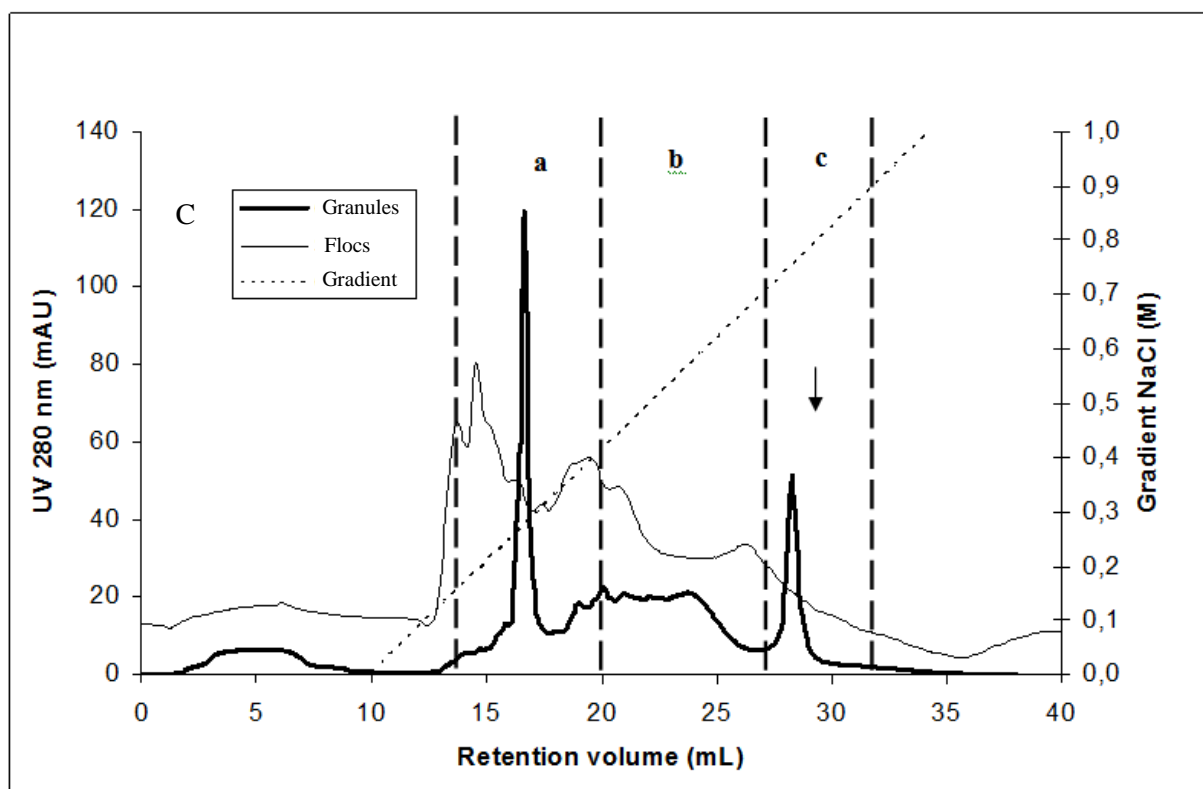


Figure 80 : Chromatographie d'échange d'anions sur colonne SourceQ des EPS extraites à partir de granules (—) et de boues floculées (—) durant les trois étapes de la première séquence du protocole multi-méthode. A : US ; B : Tween ; C : EDTA. Les extraits ont été préalablement dialysés contre du Tris 20 mM, pH8 avant injection sur la colonne SourceQ équilibrée par du Tris 20 mM, pH8. Les EPS adsorbées ont ensuite été élués en fonction de leur caractère anionique en augmentant la concentration de NaCl (-----) dans la phase mobile de 0 à 1M (échelle de droite). Les profils Chromatographiques sont mesurés à 280 nm (échelle de gauche).

Cette séparation selon la charge permet tout d'abord de confirmer la prédominance quantitative des polymères anioniques dans les granules. En effet, tous les chromatogrammes montrent que l'aire des pics correspondants aux protéines cationiques non retenues (volume de rétention inférieur à 10 mL) est faible par rapport aux pics des molécules retenues. Cette fraction EPS est de 16,0 % dans les extraits Tween, légèrement représentée pour les extraits EDTA (11,9 %) et atteint 26,0 % pour les EPS extraites par sonication. Une tendance similaire est observée sur les chromatogrammes correspondant aux floccs.

Pour les profils d'éluion des EPS anioniques, trois groupes différents sont identifiés en fonction de la concentration en NaCl nécessaire à leur éluion de la colonne : (a) EPS légèrement anioniques éluées à des concentrations en NaCl situées entre 0,10 à 0,35 M (12,5 à 18,5 mL), (b) EPS à charges anioniques intermédiaires éluées à des concentrations en NaCl situées entre 0,35 à 0,66 M (18,5 à 26,5 mL), (c) EPS hautement anioniques éluées à des concentrations en NaCl situées entre 0,66 à 0,80 M (26,5 à 30,5 mL).

Les profils anioniques obtenus pour les extraits de granules et de floccs après ultrasonication (figure 13.A) montrent que les trois groupes sont représentés dans les deux types d'agrégats. Cependant, peu de molécules du groupe c sont présentes dans le profil des boues alors qu'un pic majeur est présent dans le profil de granules. Ce pic correspond à des molécules fortement anioniques éluées à une concentration en NaCl de 0,75 M (figure 13.A, flèche verticale). Ils représentent 32,3 % de la fraction anionique totale des EPS extraites à partir de granules et seulement 15,4 % des EPS fraction anionique totale des EPS de floccs de boue activée.

Dans les extraits Tween, les EPS anioniques sont quantitativement moins représentées, ce qui confirme la faible efficacité et la non sélectivité de cette étape pour l'extraction des EPS anioniques. Le profil d'élution des EPS extraites à partir de granules montre deux fractions équivalentes: l'une située dans le groupe a et l'autre dans le groupe c (figure 80.B). Comme précédemment observé dans les extraits soniqués, les molécules appartenant au groupe c ont été éluées à 0,75 M de NaCl (figure 80.B, flèche verticale). Dans le profil de boues, les EPS n'ont pas été éluées de la colonne sous forme de pics bien résolus, mais plutôt comme des pics larges répartis dans les régions des groupes b et c.

Enfin, les profils anioniques des EPS éluées à partir des extraits EDTA des agrégats granulaires et des agrégats floculants sont très différents. On observe des molécules des trois groupes pour les deux types d'agrégats, mais dans chaque groupe, le caractère anionique des EPS est systématiquement plus fort dans les granules, et les protéines sont toujours éluées à des concentrations plus élevées en NaCl (figure 80.C). Par ailleurs, contrairement aux EPS de floccs, les EPS obtenues à partir de granules forment des crêtes étroites à l'élution. Enfin, on retrouve les molécules fortement chargées du groupe c, éluées à 0,75 M en NaCl, et ceci spécifiquement dans le profil issu de l'analyse des EPS des granules (figure 80.C, flèche verticale).

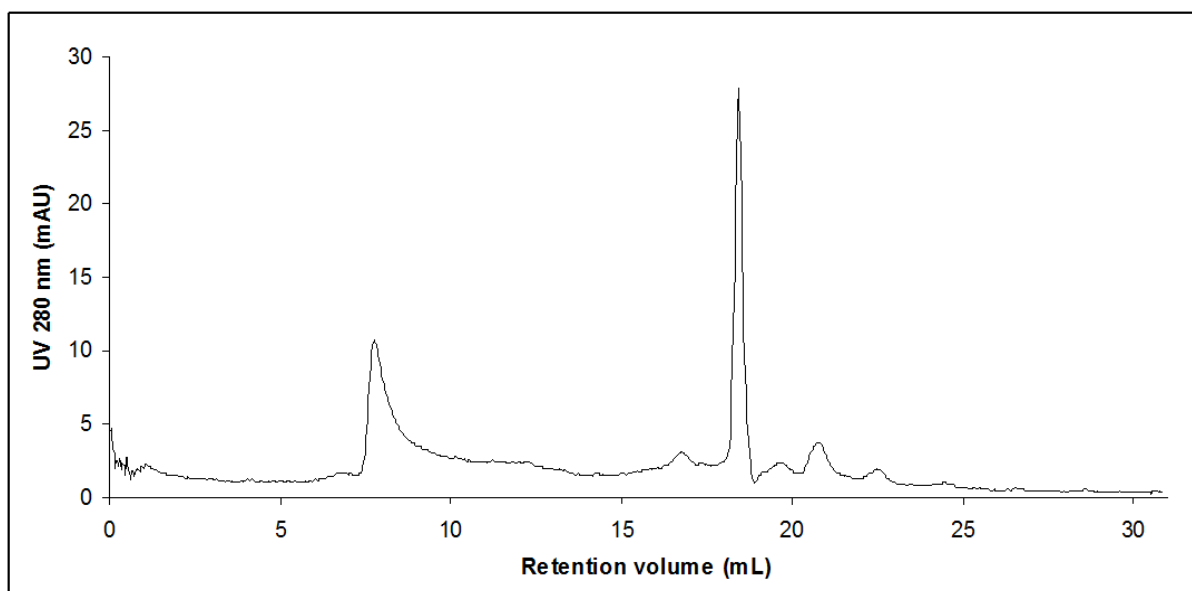


Figure 81 : Analyse par chromatographie d'exclusion stérique sur une colonne Superdex 75 des EPS hautement anioniques extraites à partir des granules lors de l'étape US de la première séquence du protocole multi-méthodes et fractionnés par chromatographie d'échange anionique (flèche verticale Fig. 6.A.).

Une caractérisation plus poussée de ces EPS a été réalisée sur le pic majoritaire élué à 0,75 M en NaCl lors de la chromatographie d'échange d'anions effectuée sur les extraits US des granules. Pour ceci, les molécules contenues dans ce pic ont été collectées, et analysées par chromatographie d'exclusion stérique en utilisant une colonne Superdex75 dotée d'une gamme étroite de résolution. Le chromatogramme correspondant est présenté sur la figure 81 et montre deux pics majeurs. Étant donné le caractère fortement anionique des molécules considérées, il est possible que les mesures de masses moléculaires soient gênées par des interactions avec la phase stationnaire de la colonne de chromatographie. Cependant, selon les résultats observés, le premier pic obtenu correspond à de petites molécules dont la taille est évaluée à environ 1,6 kDa et l'autre correspond à des molécules éluées dans le volume d'exclusion total de la colonne, à savoir des molécules ou des colloïdes dont la taille serait supérieure à 200 kDa (figure 81).

Ces données montrent que les EPS fortement anioniques sont plus représentées dans les boues granulaires par rapport aux boues floculées. Elles ont également souligné l'existence d'une fraction de molécules anioniques éluée à de fortes concentrations en NaCl (0,75 M) qui sont spécifiquement détectées dans les extraits obtenus à partir de granules.

IV. Conclusions et discussion

L'optimisation de l'étape de désintégration mécanique a permis d'améliorer l'extraction des EPS de granules tout en conservant la stratégie d'extraction multi-méthodes proposée par Ras et al. (2008). L'utilisation des billes de verre a permis d'extraire 465 mg d'EPS /g de MVS mais l'importante efficacité de l'étape mécanique limite trop les quantités de matière extraites lors des étapes chimiques pour permettre de déduire les propriétés chimiques des EPS. Dans le cas de l'intensification de l'étape d'extraction par les ultrasons, en revanche, le fractionnement des EPS extraites selon les étapes et les séquences d'extraction permet de mieux comprendre les propriétés d'adhésion de ces molécules.

En effet, ces résultats permettent tout d'abord de mettre en évidence la prédominance des protéines qui représentent 79,6 % des 292 mg d'EPS /g de MVS extraites en quatre séquences. Cette prédominance protéique est en accord avec la plupart des études présentant des résultats d'extraction d'EPS de granules aérobies (Zhang et al., 2007, Li et al., 2008, Adav and Lee., 2008, McSwain et al., 2005). Cela confirme également les observations par marquages présentées au chapitre 3.

Le fractionnement des EPS extraites selon les étapes du protocole (US, Tween, EDTA) révèle en outre la grande efficacité de l'EDTA pour l'extraction des EPS protéiques (43 % de ces polymères sont extraits durant les étapes EDTA). On peut supposer à partir de cela que l'attachement des protéines à la matrice d'EPS du granule repose sur des interactions ioniques et notamment sur l'établissement de pontage avec des cations divalents. Cette sensibilité particulièrement élevée des protéines au protocole d'extraction par l'EDTA qui n'est pas observée dans le cas des polysaccharides (extraits à 4,3 % seulement lors de cette étape), confère également aux extraits de cette étape un rapport PN / PS de 38,8, très élevé par rapport au ratio PN / PS global qui est lui de 3,6.

Ces différences de sélectivité entre les étapes du protocole multi-méthodes mettent en outre en évidence la complémentarité des méthodes utilisées et confirment ainsi l'intérêt de cette stratégie d'extraction.

Cette importance particulière des liaisons ioniques pour la cohésion des granules avait déjà été montrée dans le cas des agrégats de Seviour et al., 2009a. En effet, ces auteurs avaient observé une perte progressive d'élasticité de leurs granules (alimentés en eaux usées d'abattoir dont le rapport C/N est 2,4) lorsque le pH dépasse la valeur de 9. Ils avaient attribué ce phénomène à une présence, dans les EPS de leurs granules, de groupements chimiques dont le pKa est proche de 9 et dont la charge serait modifiée au-delà de ce pH.

Ces observations sont, en outre, cohérentes avec les résultats de chromatographie d'échange d'anions qui montrent la présence importante de groupements anioniques dans les chaînes protéiques extraites.

La répartition des polysaccharides entre les différentes étapes d'extraction (US, Tween, EDTA), en revanche, semble démontrer que ces polymères sont attachés à la matrice d'EPS par des liaisons aspécifiques car les molécules sont retrouvées beaucoup plus dans les extraits des étapes mécaniques que dans ceux des étapes chimiques Tween et EDTA. L'observation de la distribution des quantités de polysaccharides extraits aux différentes séquences d'extraction successives semble en outre montrer que ces molécules sont faiblement attachés à la matrice car elles sont extraites quasiment entièrement au cours des deux premières séquences d'extraction.

A l'inverse, les protéines sont extraites très progressivement tout au long du protocole. Ceci laisse supposer que les peptides, présents en grande quantité dans les agrégats, affichent une plus forte résistance aux procédés d'extraction. On peut supposer à partir de cela que ces molécules ont un rôle important dans la structure des agrégats.

La résistance importante à l'extraction des acides uroniques, pourtant quantitativement peu représentés dans l'ensemble des polysaccharides (2,7 % des polysaccharides) laissent également supposer un rôle cohésif qu'il faudra également préciser.

Cependant, les différences d'adhérence des polymères à la matrice ne sont pas la seule explication possible pour les disparités dans le comportement des EPS face au protocole d'extraction. En effet, il est également possible que la localisation des différentes molécules dans le granule ait aussi une influence. Ainsi, les molécules situées au centre des agrégats seraient plus difficiles à extraire que celles situées en périphérie. Si cette hypothèse s'avérait exacte, les comportements différents observés pour les protéines et les polysaccharides ne seraient plus le reflet uniquement de leurs différentes énergies de cohésion mais de la dualité entre énergie de cohésion et localisation dans l'agrégat.

Pour valider l'une ou l'autre de ces hypothèses, il serait intéressant d'analyser plus précisément les propriétés physico-chimiques des protéines extraites aux différentes séquences afin de comparer les caractéristiques chimiques spécifiques des formes extractibles en fin de procédure d'extraction, et potentiellement plus cohésives, à celles des protéines extraites dès la première séquence du protocole.

La comparaison de ces performances d'extraction avec d'autres travaux issus de la littérature (Chapitre 1 : Table 1) montre que ce protocole multi-méthode permet une meilleure extraction des EPS que les méthodes physiques basées sur les perturbations mécaniques et / ou chauffage doux (44 à 210 mg d'EPS /g de MVS) (Li et al., 2008, Wang et al., 2006, Zhang et al., 2007).

Des rendements supérieurs de 295 mg d'EPS /g de MVS sont observés lorsque les granules sont incubées pendant 30 min à 80 °C (Adav et Lee, 2008). Les extractions d'EPS effectuées avec des composés chimiques tels que NaOH et/ou le formamide EPS augmentent également l'efficacité de la récupération des protéines comme l'attestent les rapports PN / PS observés entre 6 à 8 et les rendements de 236 et 436 mg d'EPS /g de MVS (Adav et Lee, 2008, McSwain et al., 2005). Enfin, la combinaison de ces conditions chimiques drastiques avec une sonication augmente encore, de façon significative, le rendement d'extraction des EPS qui atteint 626 mg d'EPS /g de MVS répartis en 537 ± 36 mg de protéines /g de MVS et 109 ± 15 mg de polysaccharides /g de MVS extraits à partir de granules aérobie (Adav et Lee, 2008). Cependant, ces méthodes fortes présentent un risque important de lyse cellulaire. Les contaminations par de l'ADN obtenus lors des expériences de (Adav et Lee, 2008) en témoignent.

En comparaison avec la littérature, le protocole multi-méthode permet donc une bonne efficacité d'extraction des EPS mais sans provoquer de lyse cellulaire significative. Par ailleurs, le fait que la quantité d'EPS extraites de la matrice des granules après chaque séquence successive montre une diminution exponentielle devrait garantir un échantillon représentatif des EPS des granules.

Les profils chromatographiques obtenus après filtration sur gel mettent en évidence divers groupes de protéines. Les molécules majoritaires dans le granule sont observables en groupe iv (tailles de 6 à 1 kDa). Elles sont présentes dans chacun des extraits généralement à des concentrations fortes. Elles sont particulièrement extraites par l'action de l'EDTA puisqu'elles représentent 52,4 % des polypeptides extraits à ces étapes contre seulement 25,2 et 23,6 % lors des étapes ultrasons et tween, cependant, comme on les voit apparaître à chacune des étapes d'extraction, on peut penser que ces polypeptides ne possèdent pas de caractéristiques biochimiques particulières.

Le contenu des pics du groupe i est sans doute assez hétérogène puisqu'il contient l'ensemble des molécules et assemblage de molécules ne pouvant pas pénétrer dans le gel en raison de leur taille supérieure à 1 000 kDa. Il serait intéressant d'en savoir plus sur la nature de ces molécules qui ont sans doute un rôle important dans les propriétés physiques du granule.

L'observation de ces profils chromatographique dans leur globalité permet également de mettre en lumière certaines caractéristiques générales des EPS protéiques extraites. On constate tout d'abord que les deux étapes majoritaires en termes de quantité d'EPS extraites sont les étapes d'extraction par ultrasons et par l'EDTA. Ceci confirme les résultats obtenus par dosage. Cependant, si les molécules extraites par le tween apparaissent quantitativement minoritaires, cela ne signifie pas qu'elles ne

jouent pas de rôle dans la matrice des agrégats. En effet, les tailles des protéines sont plus diversifiées. Les polymères correspondant à ces nouvelles protéines, probablement hydrophobes pourraient avoir un rôle à jouer dans cohésion des granules.

Une capacité similaire de l'étape de Tween pour l'extraction d'EPS spécifiques a été observée lors de l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique des profils de tailles d'EPS extraites de biofilms matures par le protocole multi-méthodes (Ras et al., 2011).

En revanche, l'évaluation de la distribution de tailles des EPS est gênée par le phénomène d'agrégation des EPS. En effet, comme nous l'avons vu, une part importante des molécules extraites lors du protocole multi-méthodes a tendance à s'agréger et à former des colloïdes de grande taille. Lors des mesures par exclusion stérique, il n'est ensuite pas possible de mesurer les tailles de ces EPS car elles sont éluées directement dans le volume d'exclusion totale de la colonne et forme ainsi le groupe i. Il est donc difficile de commenter globalement les profils de tailles des EPS protéiques de nos agrégats.

En outre, comme le soulignent Simon et al. (2009) dans leur étude recourant à l'analyse par chromatographie d'exclusion stérique de leurs EPS extraites de granules anaérobies, d'autres perturbations peuvent encore troubler les analyses chromatographiques. En particulier, il peut être difficile de mesurer précisément les tailles des EPS, car il est possible que celles-ci établissent des interactions avec la résine des colonnes de filtration. Dans notre cas, de tels phénomènes peuvent être particulièrement gênants car les molécules analysées sont justement extraites selon leurs propriétés chimiques.

Il apparait, en outre, intéressant d'analyser le contenu des pics après récupération par le collecteur de l'appareil de chromatographie. Ces analyses pourront se faire soit par des techniques de dosage colorimétrique ou d'autres méthodes d'analyse moléculaire comme les analyses de spectre infrarouge utilisées notamment par D'Abzac et al., 2010a, soit par passage dans d'autres colonnes de chromatographie (échange d'ion, interaction hydrophobe). Une séparation par une colonne plus résolutive permettrait également d'identifier des protéines masquées par d'autres molécules de tailles voisines mais plus représentées.

La prédominance des protéines chargées négativement dans les boues granulaires par rapport aux boues floculées est confirmée par chromatographie échangeuse d'anions effectuée à pH 8 de manière à se placer dans les conditions de fonctionnement du réacteur SBR. En outre, dans ces conditions, nous avons montré que les extraits provenant des granules contenaient des molécules hautement anioniques éluées à la concentration de NaCl de 0,75 M.

L'analyse de la distribution de la taille de ces EPS hautement anioniques récupérées après fractionnement par chromatographie d'échange d'anions a révélé deux fractions: l'une correspond à un EPS de faible poids moléculaire d'environ 1,6 kDa et l'autre aux molécules éluées dans le volume d'exclusion totale de la colonne, c'est à dire avec des poids moléculaires au-dessus de 200 kDa. Ces EPS hautement anioniques sont donc composées de différents polymères qui peuvent être extraits sous forme de molécules simples ou associés. L'identification de la nature des motifs chimiques impliqués dans une telle association pourrait donner de plus amples informations sur les bases moléculaires de l'agrégation EPS *in situ*. Une étude récente indique que l'augmentation de la cohésion est le phénomène initial permettant d'expliquer la formation de granules de façon concomitante avec la densification des agrégats de bactéries (Wan et al., 2011).

Pour conclure, au terme de ce chapitre, nous avons obtenu certains résultats importants :

- Le protocole d'extraction multi-méthodes proposé, utilisant les ultrasons, est efficace et permet la récupération de 292 mg d'EPS /g de MVS non contaminés par du contenu intracellulaire.
- Les composés majoritaires de ces EPS sont les protéines (79,6 % de la masse totale)
- Comme on a pu le voir, en particulier, au travers des analyses chromatographiques, les EPS des granules sont caractérisées par une très grande diversité de tailles et de propriétés chimiques.
- Les méthodes de fractionnement par le protocole d'extraction et les expériences de chromatographie ont montré l'importance au sein des granules des interactions ioniques et du pontage par des cations divalents.

Il serait intéressant de savoir si la présence d'EPS fortement anioniques dans les granules peut expliquer les propriétés de cohésion des agrégats. Des stratégies d'études devront être mises au point afin de détailler les fonctions de ces molécules au sein des granules et leurs apports aux propriétés physiques de la matrice d'EPS des agrégats. Pour cela, nous avons envisagé le recours à des stratégies de digestions enzymatiques et de traitements chimiques effectués directement sur les granules afin d'observer l'impact de l'hydrolyse spécifique de certains composés de la matrice ou de la déstabilisation de certaines interactions sur les propriétés physiques de l'agrégat et en particulier, sur sa résistance à des contraintes hydrodynamiques.

Chapitre 5 : Etude du rôle des EPS dans la cohésion des granules

I. Altération des granules par digestion enzymatique des EPS

Comme nous l'avons vu, la matrice d'EPS des granules est un mélange complexe de molécules différentes. Les protéines constituent les composés majoritaires extraits de ces agrégats, cependant, ces derniers contiennent également une grande quantité de polysaccharides regroupant eux-mêmes des polymères de différentes natures. Chacun de ces différents composants est caractérisé par ses propriétés chimiques propres. Les observations en microscopie confocale de granules marqués en coupe, ont également révélé que la localisation des différents types moléculaires n'était pas la même. En effet, les protéines sont caractérisées par une distribution globale dans le granule beaucoup plus homogène que celle des polysaccharides beaucoup plus concentrés en surface de la matrice et formant en outre des gangues autour de certaines microcolonies de cellules. De par ces disparités, chacune des molécules de la matrice d'EPS peut remplir une fonction différente au sein de l'agrégat.

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser au rôle que jouent ces différents types moléculaires vis-à-vis de la cohésion des granules. Pour cela, nous proposons de traiter les granules natifs par des enzymes ciblant spécifiquement différents types moléculaires pouvant être représentés dans les granules, et d'évaluer l'impact de ces digestions ciblées sur la cohésion des agrégats.

I.1. Effets des enzymes sur la matrice d'EPS des granules

Etant donné le nombre de molécules différentes pouvant entrer en jeu dans la cohésion des granules, il a été nécessaire, dans le cas de notre étude, de sélectionner quelques enzymes en fonction de leur spécificité par rapport au substrat. Cette spécificité se définit bien sûr en fonction de la nature chimique de la molécule substrat, mais aussi en fonction du mécanisme de digestion qui peut être endogène (hydrolyses en milieu de chaîne) ou exogène (hydrolyses aux extrémités des chaînes).

Les protéines étant très largement représentées dans la matrice des granules, il est vraisemblable qu'elles jouent un rôle dans les propriétés physiques de ces agrégats. Une protéase aspécifique d'origine bactérienne, la Savinase (de *Bacillus clausii*) (EC=3.4.21.14), a été retenue car plus susceptible d'hydrolyser les diverses protéines de la matrice que des protéases digestives à spécificité étroite.

En revanche, dans le cas des polysaccharides, comme on l'a vu en partie étude bibliographique (paragraphe III.1.), il est possible de différencier de grands ensembles de types moléculaires ciblés par des enzymes différentes et, bien entendu, caractérisés par des comportements chimiques distincts.

Selon Seviour et al. (2009a) et Adav et al. (2008), les α -glucanes liés en α (1-4) occupent un rôle important dans la cohésion des granules. Comme dans ces articles, leur digestion a été effectuée par deux enzymes différentes : une α -amylase (provenant de *Aspergillus oryzae*, action endogène ; EC=3.2.1.1) et une β -amylase de l'orge (action exogène ; EC=3.2.1.2). Il est important pour nous de reproduire ces expériences, en particulier parce que les granules utilisés par ces équipes de recherche (granules alimentés par de l'eau usée synthétique présentant un rapport C/N de 1,4 dans le cas de Adav et al. (2008), et agrégats granulaires alimentés en eau usée d'abattoir dont le rapport C/N est 2,4, pour Seviour et al. (2009a)) sont différents de ceux étudiés ici.

Parmi les α -glucanes, nous avons également choisi de tester les dextrans. En effet, ces polymères de glucose liés en α (1-6) sont aussi retrouvés dans certaines matrices d'EPS d'agrégats bactériens. Ils ont été hydrolysés par de la dextranase de *Chaetomium erraticum* à action endogène (EC=3.2.1.11).

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la nature et est produit aussi bien par les plantes que par les bactéries. La biogenèse de cellulose bactérienne et le rôle de la cellulose dans la formation de biofilms a été décrite pour un certain nombre d'espèces bactériennes : *Gluconacteobacter xylinus*, *Sarcina ventriculi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas fluorescense...* (Pamp et al. (2007), Bielecki et al. (2005)). Par conséquent, il était également intéressant de déterminer si ce polymère de glucoses liés en β (1-4) joue un rôle dans les propriétés physiques des granules que nous étudions. Pour cela, nous avons eu recours à une **cellulase** d'*Aspergillus niger* (action endogène ; EC=3.2.1.4) qui clive les liaisons β (1-4) de polymères de glucose.

De part le rôle structural qu'ils tiennent lorsqu'ils sont intracellulaires, il est possible que les glycosaminoglycanes jouent un rôle dans la cohésion de la matrice d'EPS des granules. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons eu recours à des digestions par du **lysozyme** d'œuf de poule (EC=3.2.1.17) qui catalyse de manière endogène l'hydrolyse des liaisons β (1-4) entre les résidus d'acide N-acétylmuramic et N-acetyl-D-glucosamine dans les glycosaminoglycanes.

Des polysaccharides chargés comme les alginates entrent également en jeu dans la formation de biofilms. Leur rôle est parfois très important du fait de leur capacité à former des gels très résistants en présence de calcium. C'est le cas, par exemple des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* où leur rôle a particulièrement bien été étudié (Gacesa (1998), Stapper et al. (2004), Cotton et al. (2009)). Nous nous sommes intéressés donc aussi à leur rôle grâce à des digestions par de l'alginate lyase de *flavobacterium sp.* (action endogène ; EC=4.2.99.4).

Les enzymes possèdent des niveaux d'activité spécifiques différents et sont aussi de tailles très différentes. Par exemple, il y a presque un facteur 3 entre la taille du lysozyme qui mesure 23 238 Da, et celle de la β -amylase de 59 665 Da. Or, ces disparités de tailles peuvent également être à l'origine de disparités quant à la capacité de ces enzymes à diffuser dans les agrégats, et donc, à atteindre leurs substrats.

Lors de leur étude sur l'utilisation d'enzymes pour éliminer des biofilms de canalisations métalliques, Pechaud et al., (manuscrit soumis) ont évalué le temps nécessaire à la savinase (27 000 Da) pour pénétrer à l'intérieur d'une matrice d'EPS. Il est possible d'adapter ces calculs en prenant en compte les caractéristiques des granules et ainsi de déduire t_{90} , la durée nécessaire pour que la pénétration de l'agrégat soit complétée à 90 %. Pour cette étude, on considèrera que l'épaisseur de matrice d'EPS à traiter est de 1 mm. En effet, selon les observations microscopiques des granules en coupe effectuées au chapitre 3, les EPS des granules ne dépassent pas cette profondeur, le centre des agrégats étant occupé par un cœur minéral.

Dans le cas de la savinase, cette durée est de 10 h et 2 min (Calcul présenté en annexe 2). Par conséquent, on peut estimer qu'une durée de 24 h est effectivement suffisante pour les digestions enzymatiques, même en tenant compte des écarts de masses moléculaires entre les différentes enzymes.

Le protocole utilisé est récapitulé dans la figure 82. Les granules sont donc soumis à des incubations dans des solutions d'enzymes pendant 24 h, à 35 °C sous agitation. Afin de pouvoir plus facilement mesurer l'impact de ces traitements sur les agrégats, les granules utilisés sont, au préalable tamisés à 2,82 mm ce qui permet de limiter fortement la diversité de tailles des agrégats natifs avant traitement (GrN). Suite à ces incubations, les agrégats sont tamisés à l'aide d'un tamis de 315 μ m. Le retentât composé des granules traités et des plus grosses particules détachées (Phase GrT et MaT) sera utilisé pour mesurer l'impact des enzymes sur la résistance à des contraintes hydrodynamiques. Une mesure de la masse de MV détachée, de turbidité par absorbance à 640 nm et un dosage de calcium seront effectués sur les tamisats, c'est-à-dire la phase soluble et microparticulaire (SoMiT). Ces résultats sont évalués par comparaison avec des granules ayant subi une incubation identique en l'absence d'enzyme, dans du tampon PBS 1 X.

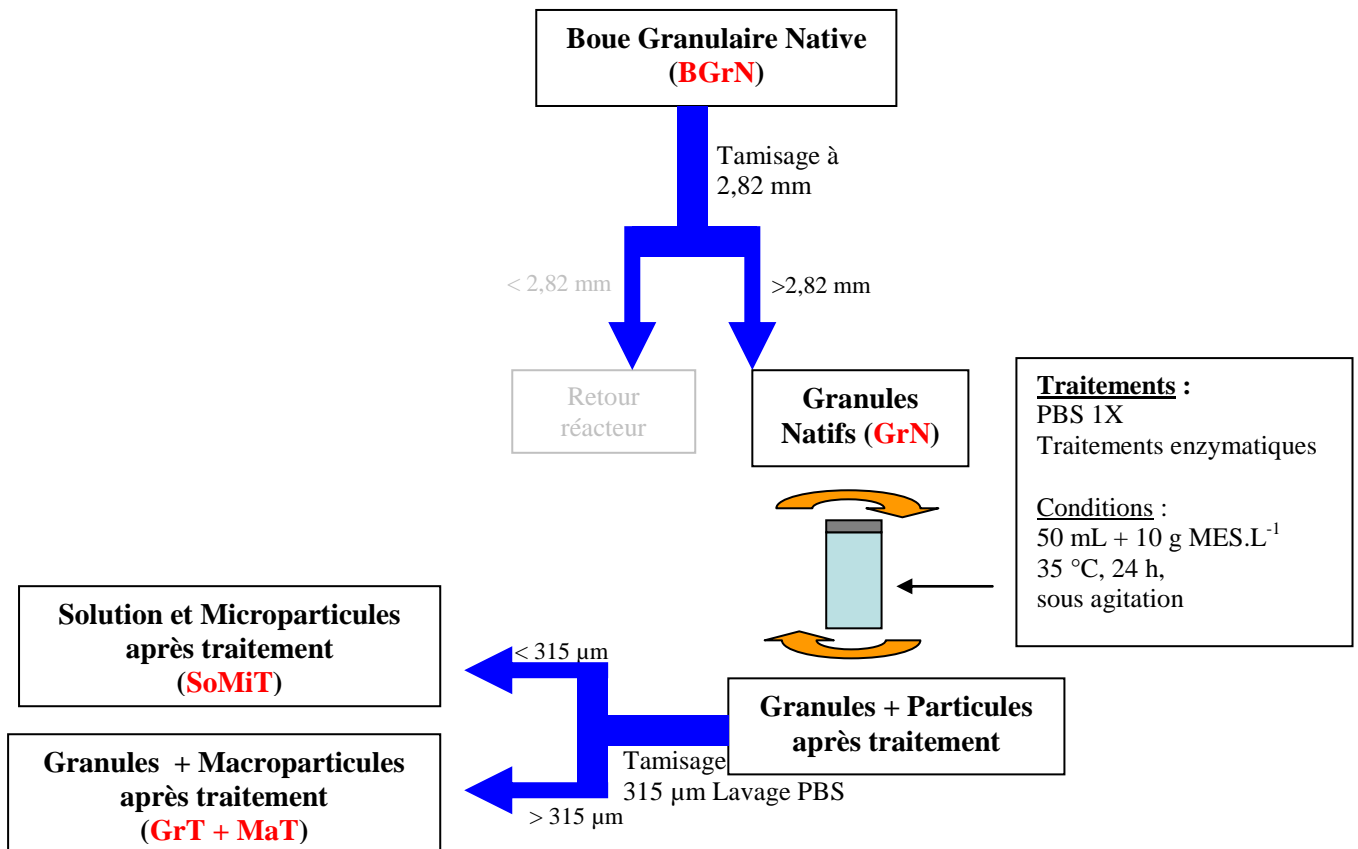


Figure 82 : Protocole utilisé pour les traitements enzymatiques des granules.

Nous avons ensuite mesuré l'impact de ces différentes digestions sur les granules et en particulier sur leur résistance aux contraintes physiques.

I.1.1. Transfert de matière organique

Une première estimation de l'effet des différentes enzymes sur la structure des granules est effectuée à l'aide de la mesure des masses de matière détachées pendant la digestion. Pour cela, on mesure la masse de matière volatile (MV) de la phase SoMit obtenue par traitement enzymatique. Cette phase étant obtenue par tamisage à 315 µm des granules traités, elle contient les microparticules détachées des granules mais aussi la matière solubilisée. Elle contient également les enzymes digestives utilisées pour les traitements. Or, les masses de MV mesurées dans les phases SoMit étudiées sont inférieures aux masses de MV des enzymes initialement ajoutées dans les solutions de digestion. Il est probable qu'une partie de ces enzymes se soit adsorbées sur les granules et particules des phases GrT et MaT. Cependant, il est difficile d'établir dans les phases SoMit quelle part des masses de MV correspond aux enzymes et quelle part correspond à des EPS libérées par le traitement. Par conséquent, il n'est pas possible de déduire les effets des enzymes utilisées de ces résultats.

Le dosage de la turbidité par l'absorbance à 640 nm, sur le tamisât à 315 µm (solution et phase microparticulaire SoMit) permet de déterminer les enzymes provoquant le relargage par les granules, de particules et colloïdes dans le milieu. Comme on peut le voir sur la figure 83, toutes les enzymes génèrent une augmentation significative de la turbidité. Mais deux enzymes se distinguent. La savinase spécifique des protéines, et l' α -amylase, hydrolysant les liaisons α (1-4) des glucanes, provoquent un relargage très important, aussi bien dans le cas de R1 que de R2 (figure 83).

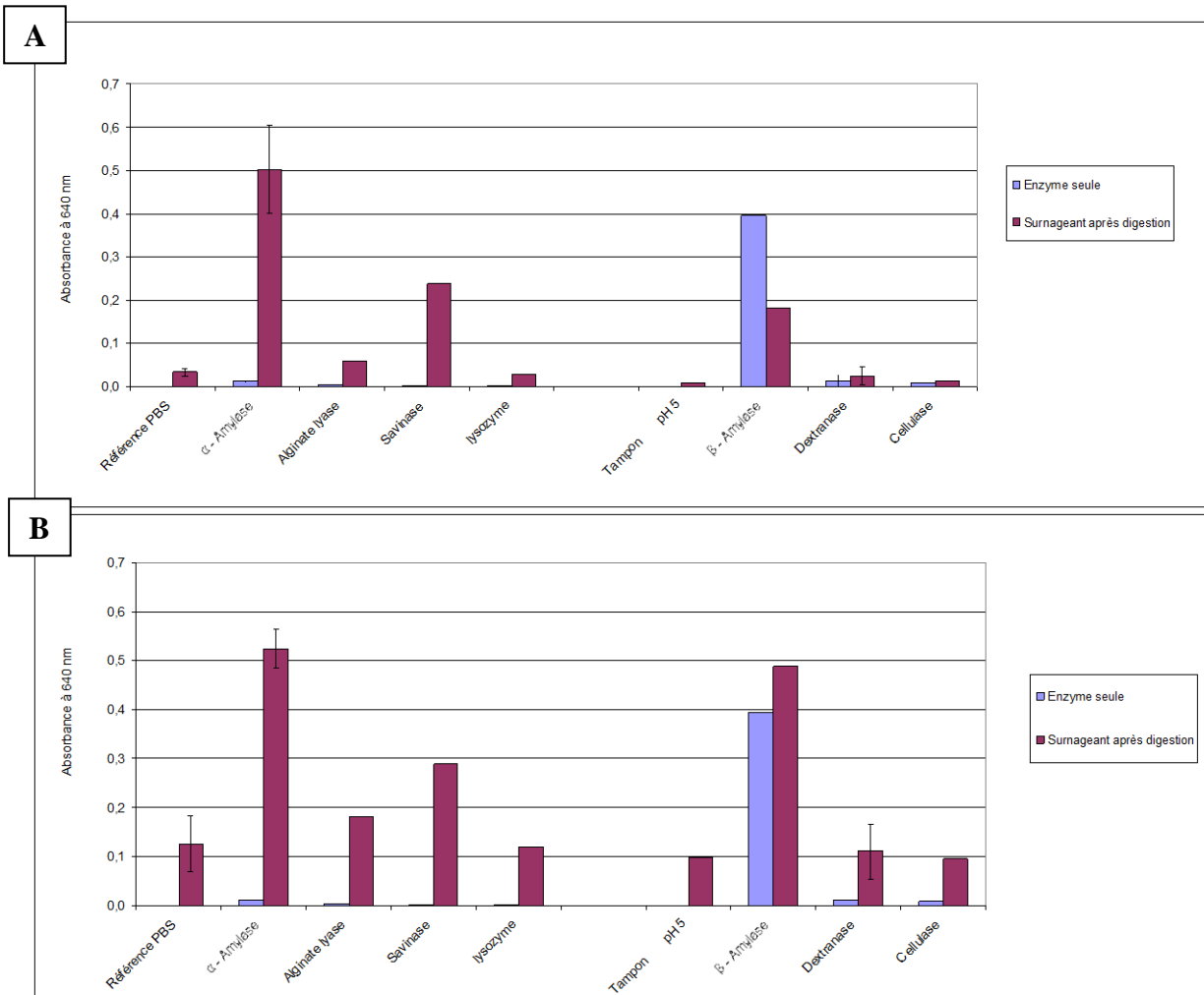


Figure 83 : Absorbances à 640 nm des phases SoMiT après 10 min de décantation des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B). Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence dans le cas des digestions par l' α -amylase, l'alginate lyase, du lysozyme et de la savinase, et une incubation similaire dans du tampon pH 5 sert de référence dans le cas des digestions par la β -amylase, la dextranase et la cellulase.

Dans le cas de la β -amylase, on remarque que contrairement aux autres enzymes, la présence de l'enzyme dans le milieu provoque en elle-même une turbidité très importante rendant ainsi difficile la mesure d'une turbidité due au relargage de matière du granule consécutive à la digestion enzymatique. Par conséquent, cette expérience ne permet pas de mesurer l'impact de la β -amylase sur les agrégats granulaires.

Ce résultat nous permet de déduire la présence importante de protéines et d' α (1-4) glucanes dans l'agrégat puisque leur digestion provoque un relargage de matière. Dans une moindre mesure, on observe également un relargage de matière consécutif aux digestions des granules de R1 et R2 par l'alginate lyase (enzyme provoquant l'hydrolyse des liaisons β -(1-4)-D-mannuroniques des polymères d'acide uroniques). Bien que présent en quantités assez faibles, comme l'ont montré les résultats de dosage d'EPS extraites, les acides uroniques ont peut-être un rôle dans le maintien de la cohésion des granules.

Si on compare les résultats obtenus avec les granules issus des deux réacteurs, on constate des profils de sensibilité aux enzymes assez similaires, cependant, les agrégats du réacteur R2 semblent plus sensibles au relargage que ceux du réacteur R1, et ce, même en l'absence de digestion enzymatique (granules incubés dans le PBS 1X) (figure 2). Ce phénomène est sans doute du au moins en partie à la présence de filaments en surface des granules de R2 qui vont facilement se détacher au cours des traitements de 24 h. De plus, il est également possible que, de par l'alimentation différente du réacteur R2 et les populations microbiennes le caractérisant, les granules de ce réacteur aient une résistance physique plus faible.

I.1.2. Transfert de cations divalents

De par la capacité du calcium à entrer dans la composition de gels (Sobeck and Higgins, 2002, gels d'alginate), et en particulier de gels dont la structure est garantie par des interactions ioniques, il est probable que ce cation soit présent en quantité importante dans les agrégats. Au sein des granules, les cations divalents peuvent constituer des ponts ioniques afin de relier les différentes espèces chimiques anioniques de la matrice d'EPS. Un tel rôle des ions calcium expliquerait l'efficacité particulièrement importante de l'EDTA lors des extractions. C'est pourquoi, les ions calciums présents dans les tamisats à 315 µm (phase SoMiT) ont été dosés à l'aide d'un spectromètre à absorption atomique. Il s'agit à la fois de calcium ionique soluble (Ca^{2+}) et de calcium associé aux particules détachées (MiT). Les résultats du dosage représentés dans la figure 84, mettent en évidence un certain nombre d'enzymes provoquant le relargage de calcium au cours des digestions.

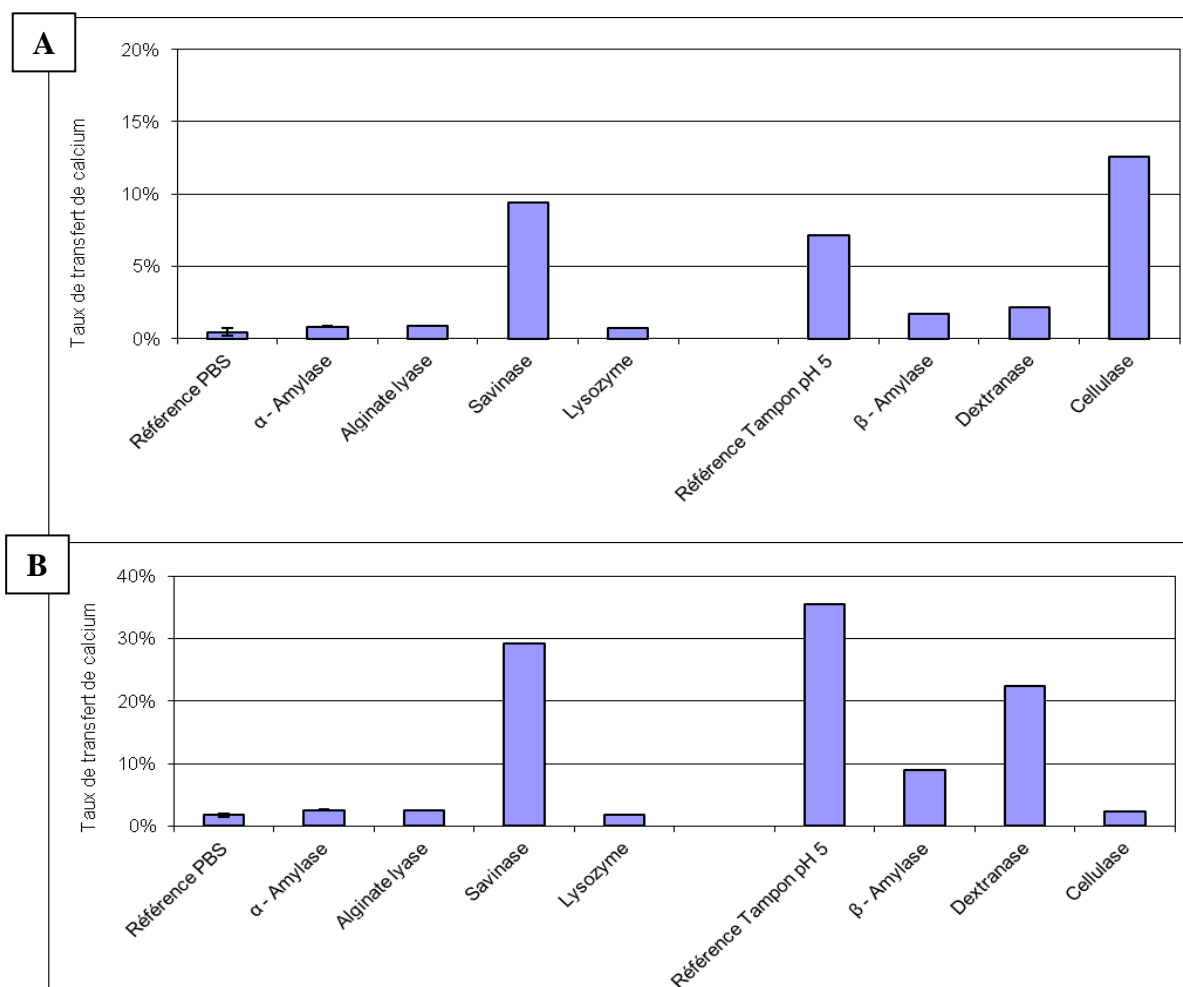


Figure 84 : Taux de transfert de calcium dans les phases SoMiT des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B). Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence dans le cas des digestions par l'α-amylase, l'alginate lyase, du lysozyme et de la savinase, et une incubation similaire dans du tampon pH 5 sert de référence dans le cas des digestions par la β-amylase, la dextranase et la cellulase.

Dans le cas des granules provenant des deux réacteurs, la digestion des protéines par la savinase entraîne la libération de calcium dans le milieu liquide et/ou adsorbé sur les microparticules : environ 10% et 30% du calcium granulaire est relargué pour les granules de R1 et R2 respectivement (figure 3). Ceci est tout à fait cohérent avec les résultats que nous avons obtenus lors des extractions d'EPS. En effet, nous avons observé que l'EDTA, un chélateur de cations divalents provoquait la sortie massive de protéines de la matrice d'EPS des granules. Les ions calcium, en s'intercalant entre deux acides aminés anioniques, stabilisent les interactions protéine-protéine, et créent ainsi une structure proche de celle d'un gel. Lors de la digestion par la savinase, les ions calcium sont libérés de cette structure en même temps que les protéines et sont dosés dans les tamisats.

La digestion par la cellulase des granules du réacteur R1 provoque le relargage de 12,6 % du calcium granulaire mais n'entraîne aucun relargage significatif de calcium pour les granules du réacteur R2. Dans le cas du réacteur R2, c'est la dextranase qui provoque le relargage du calcium (22,4 % du calcium granulaire) alors qu'elle ne semble pas avoir d'effet notable sur les granules du réacteur R1. Cependant, on remarque également que le tampon pH 5 seul provoque déjà un relargage important, en particulier dans le cas des granules du réacteur R2. Ce relargage pourrait donc être lié à un effet pH plutôt qu'à l'effet de ces 2 enzymes. En outre, les cristaux d'hydroxyapatite constituant le cœur des granules étant particulièrement soluble à pH 5, il se pourrait que le calcium dosé provienne de là plutôt que de la matrice d'EPS.

On peut également souligner le fait que dans le cas des deux réacteurs, l' α -amylase, qui provoquait des augmentations de turbidité (figure 84), n'a pas entraîné de relargage de calcium plus important que le témoin PBS. Si les substrats de ces enzymes ont probablement un rôle très important vis-à-vis de la cohésion, comme le souligne les travaux de Adav et al., 2008, et Seviour et al. (2009 a et b), ceux-ci par contre, ne sont généralement pas chargés. Il s'agit en effet de polymères de glucose liés en α (1-4) qui ne présentent pas de charges ioniques. Par conséquent, il n'est pas surprenant que la libération des ces molécules consécutive à la digestion enzymatique ne provoque pas de relargage de calcium.

I.2. Analyse de la cohésion des granules digérés par les enzymes

Comme indiqué lors de la présentation de la mesure de la résistance des granules (chapitre 3), les conditions hydrodynamiques choisies correspondent à une agitation à 550 rpm pendant 20 min, par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL. Afin d'évaluer la possible altération des granules suite aux traitements enzymatiques, ces contraintes ont été imposées à la phase composée des granules ainsi que des macroparticules après traitement mentionnée dans les figures 1 et 4 (GrT + MaT). Par la suite, les fragments d'agrégats résultant de la contrainte hydrodynamique sont séparés en plusieurs fractions par une série de tamisages. Le protocole utilisé est détaillé dans la figure 85. Comme précédemment, les transferts de matière organique et de calcium ont été analysés afin d'évaluer l'impact des traitements enzymatiques sur la résistance des granules aux contraintes de cisaillement choisies.

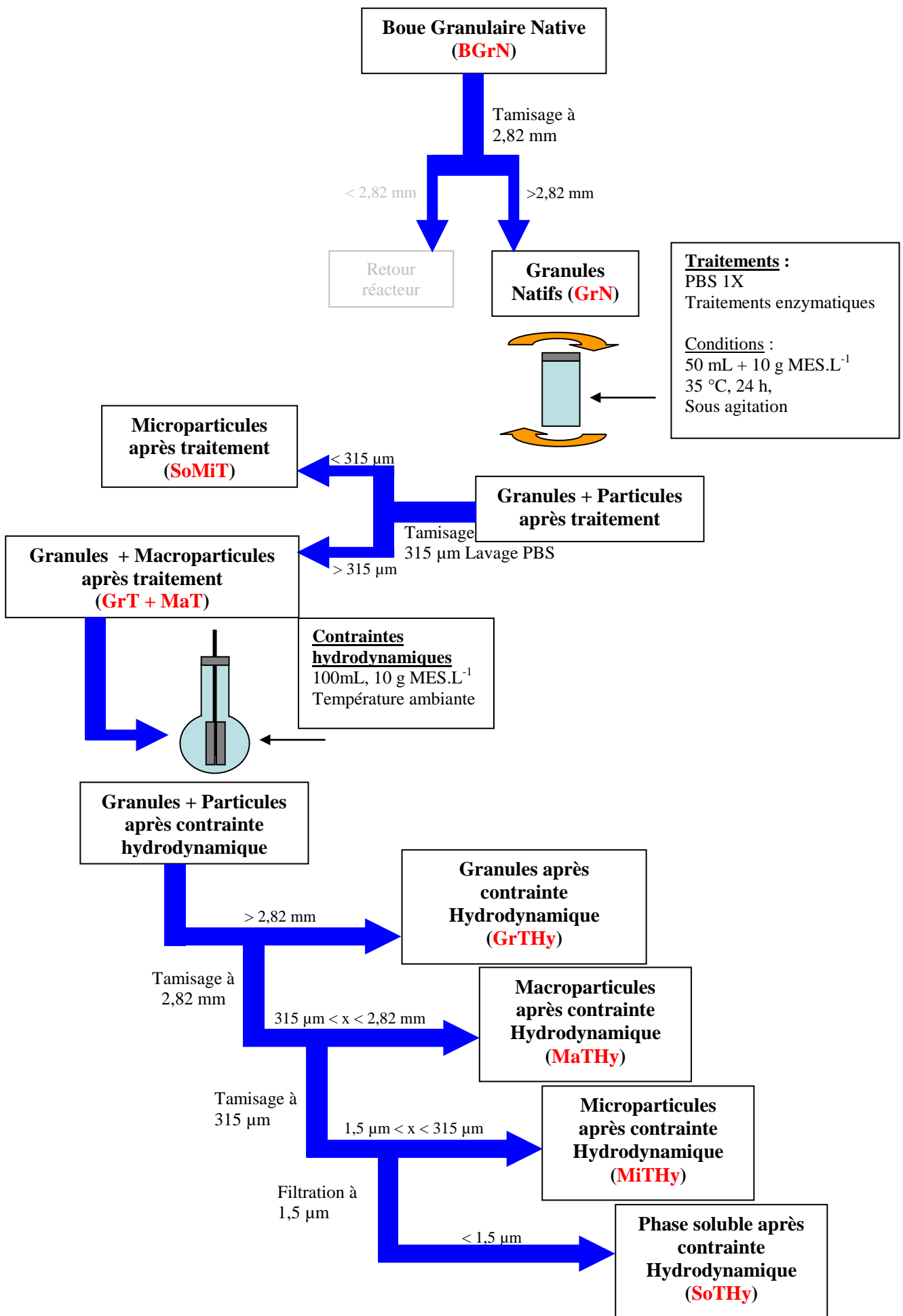


Figure 85 : Protocole de mesure de la résistance aux contraintes hydrodynamiques après traitement enzymatique.

I.2.1. Effet sur la taille des granules

Tout d'abord, nous avons mesuré les effets des contraintes hydrodynamiques sur les diamètres des granules soumis à des digestions enzymatiques. Ces mesures sont effectuées sur la phase granulaire uniquement (tailles supérieures à 2,82 mm). La figure 86 présente les distributions de tailles ainsi que la représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres des granules traités par chacune des enzymes puis soumis à la contrainte hydrodynamique (GrTHy).

Comme on le voit en figure 86.A. et 86.B., la mesure de la variation de distribution de taille ne permet pas de visualiser des effets importants dans les conditions du test. On peut noter toutefois le cas particulier de l' α -amylase qui semble provoquer, dans le cas des granules de R1, une disparition des agrégats de plus gros diamètre, proches de 3,8 mm au profit d'agrégats plus réduits et notamment ceux de diamètres proches 3,3 mm. La savinase semble avoir un comportement similaire sur les granules de R2 provoquant une diminution du nombre d'agrégats de diamètres proches de 4,8 mm au profit d'agrégats de diamètres proches de 3,8 mm. Cependant, si l'on s'intéresse aux représentations en boîtes à moustaches (figure 86.C. et 86.D.), on remarque qu'aucune des mesures effectuées sur des granules ayant subi une digestion enzymatique ne se démarque significativement par rapport aux références PBS et tampon pH 5.

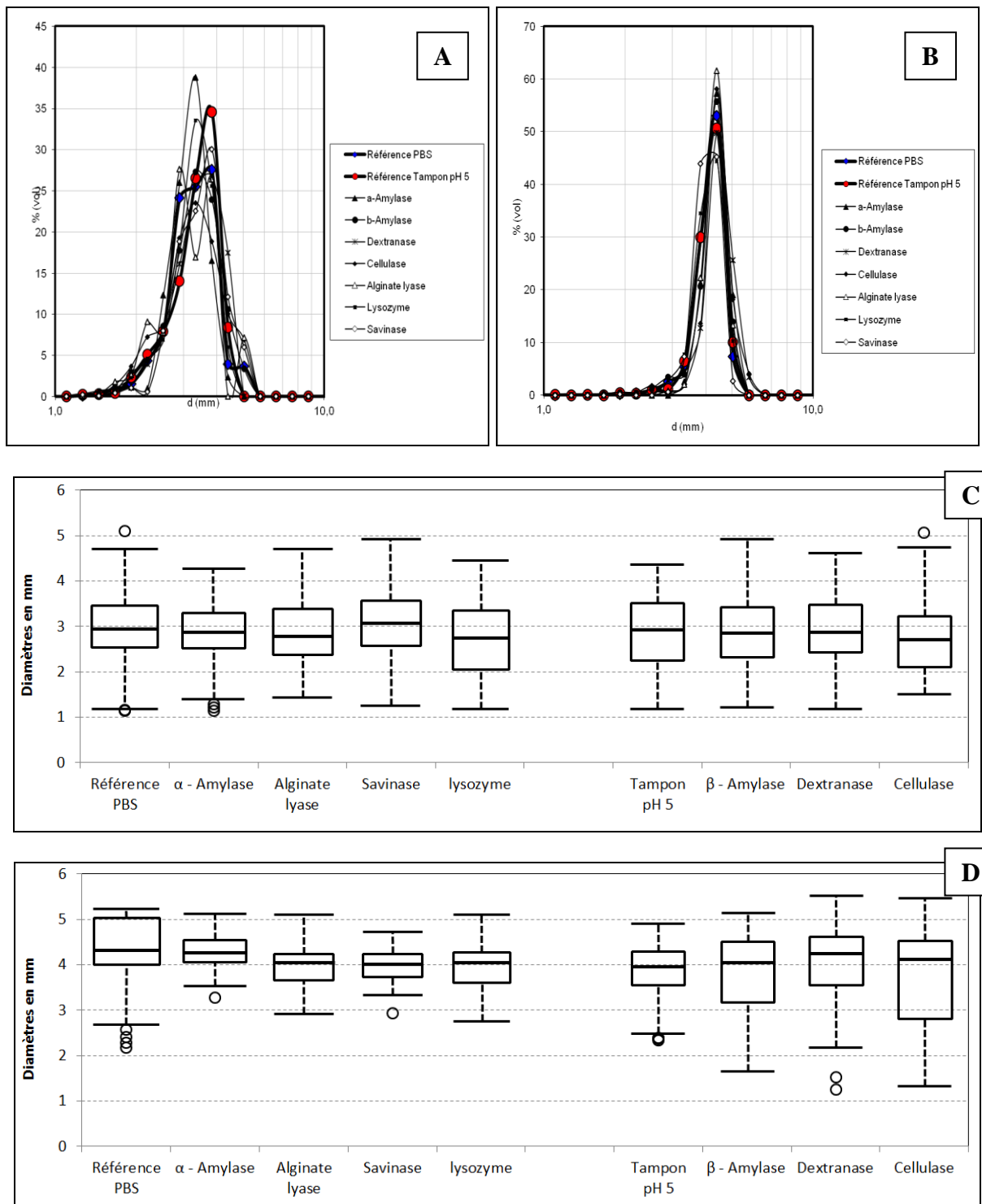


Figure 86 : Distribution des diamètres des granules de la phase GrTHy prélevés après application de contraintes hydrodynamiques sur les granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements enzymatiques et représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres pour les réacteurs R1 (C) et R2 (D). Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence dans le cas des digestions par l' α -amylase, l'alginate lyase, du lysozyme et de la savinase, et une incubation similaire dans du tampon pH 5 sert de référence dans le cas des digestions par le β -amylase, la dextranase, et la cellulase. La barre horizontale en gras à l'intérieur de chaque boîte à moustaches représente la valeur de diamètre médian. Les bords hauts et bas de la boîte représentent respectivement les 3èmes et 1ers quartiles. Les traits horizontaux aux bouts des lignes pointillées représentent les valeurs maximales et minimales des diamètres mesurés à l'exclusion de certaines valeurs exclues. Les valeurs exclues de cette représentation sont les valeurs à une distance de la valeur médiane deux fois et demi supérieure à l'écart entre le 1er et le 3ème quartile. Ces valeurs sont représentées par des cercles sur le graphique.

I.2.2. Transfert de matière organique

Afin d'analyser plus précisément les effets des contraintes hydrodynamiques sur les granules digérés par chacune des enzymes des mesures de masses de matières détachées ont ensuite été effectuées sur les phases SoTHy, MiTHy, et MaTHy. La figure 87 représente les taux de transfert de MV obtenus qui correspondent à la masse de MV contenue dans les phases considérées rapportée à la masse de MV totale de granules initiale (calculée en faisant la somme des masses de MV de chaque phase obtenue à partir de ces granules).

D'autre part, afin de mettre en évidence une solubilisation de petites particules, voir de colloïdes, des mesures de la turbidité (absorbance à 640 nm) ont été réalisées sur les tamisats à 315 μm correspondant aux phases MiTHy + SoTHy avant filtration sur le tamis de 1,5 μm (figure 88).

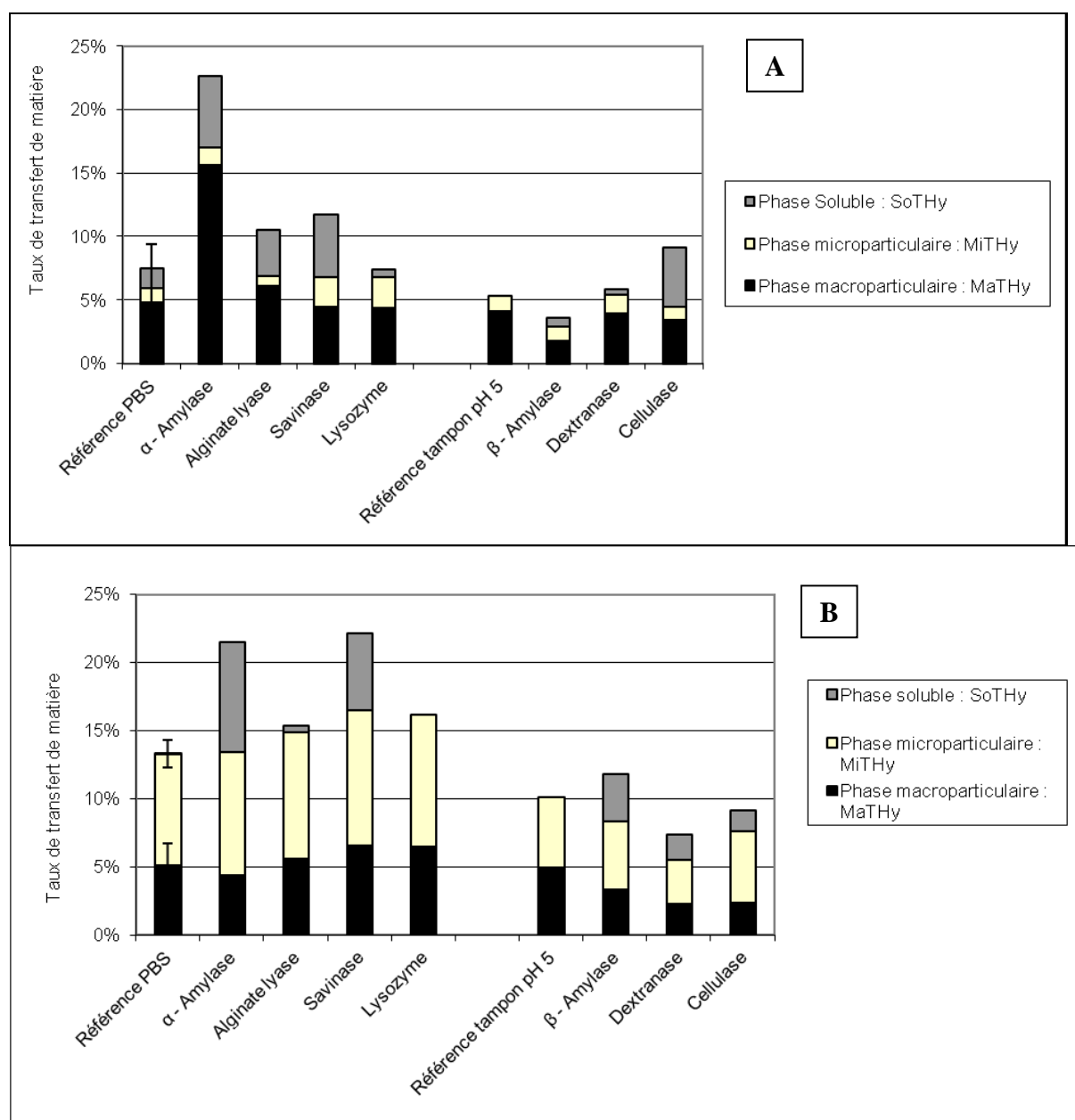


Figure 87 : pourcentages massiques des matières volatiles totales contenues dans les phases SoTHy, MiTHy et MaTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL sur des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements enzymatiques. Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence dans le cas des digestions par l'α-amylase, l'alginate lyase, du lysozyme et de la savinase, et une incubation similaire dans du tampon pH 5 sert de référence dans le cas des digestions par la β-amylase, la dextranase, et la cellulase.

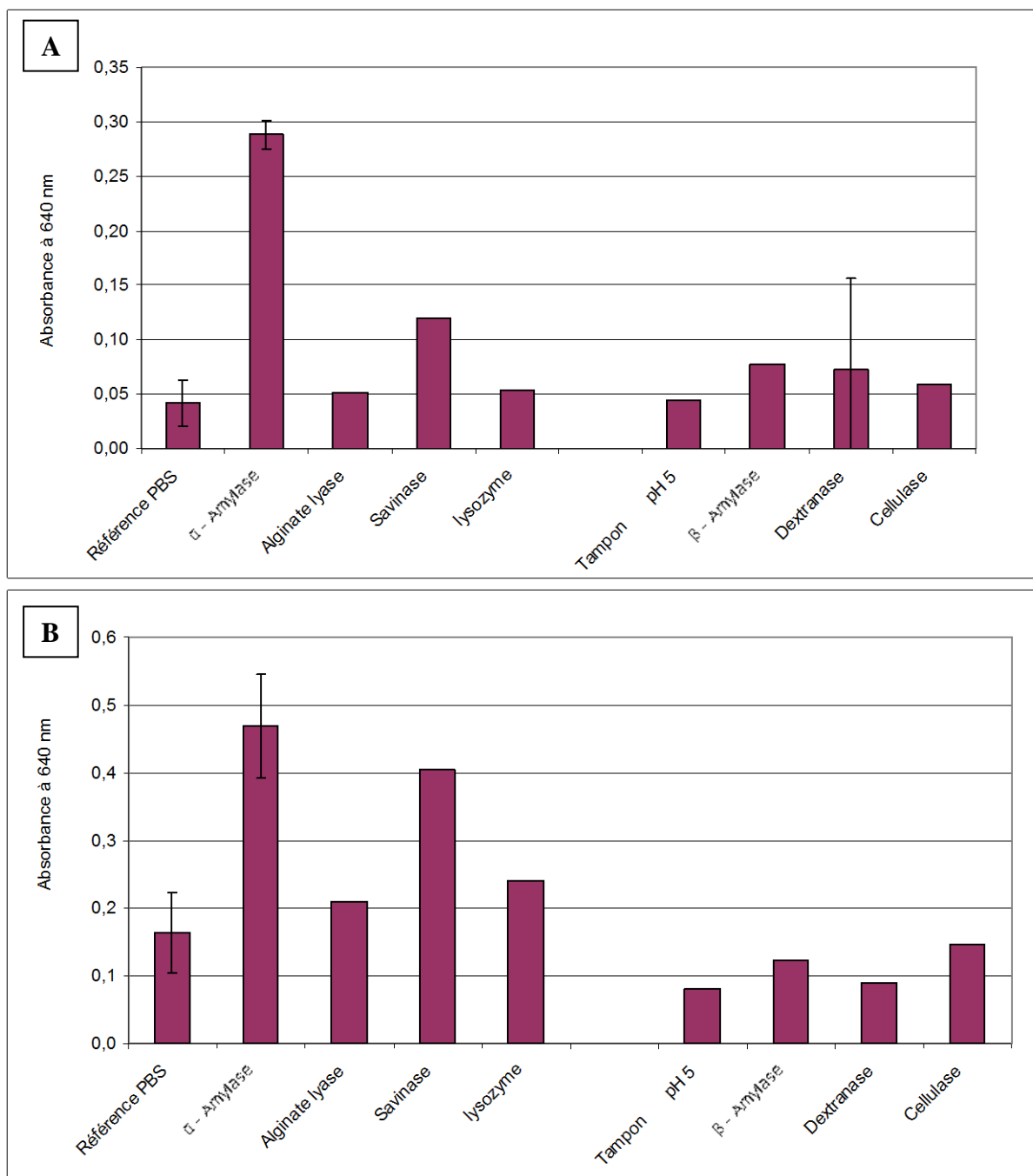


Figure 88 : Absorbances à 640 nm après décantation de 10 min des phases MiTHy + SoTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL sur des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements enzymatiques. Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence dans le cas des digestions par l'α-amylase, l'alginate lyase, du lysozyme et de la savinase, et une incubation similaire dans du tampon pH 5 sert de référence dans le cas des digestions par la β-amylase, la dextranase et la cellulase.

Lorsque l'on mesure les masses de particules qui se détachent des granules lors des contraintes hydrodynamiques (figure 87), on constate que l'α-amylase et la savinase sont à nouveau les enzymes qui conduisent à une augmentation significative du relargage de particules (macro et micro) après contraintes hydrodynamiques.

En ce qui concerne les expériences réalisées sur les granules de R1, l'enzyme qui provoque la perte la plus significative de matière est l' α -amylase puisque la quantité de matière retrouvée dans la phase macroparticulaire augmente d'un facteur 3,3 par rapport à la référence correspondant à une incubation dans le PBS seul. Le détachement de micro-particules est par contre peu augmenté comparé à celui observé dans les conditions de PBS. Les mesures de turbidité par l'absorbance à 640 nm (figure 88) confirment ce rôle prépondérant des α (1-4) glucanes à la fois dans les granules de R1 puisque les valeurs de turbidités mesurées pour les digestions par l' α -amylase augmentent d'un facteur 6,9 par rapport à la référence PBS. Quoique moins marqué, l'effet de l' α -amylase est aussi visible sur les granules du réacteur R2 puisque les valeurs de turbidités augmentent d'un facteur 2,9 par rapport à la référence PBS. Comme le laissaient supposer les mesures de turbidité réalisées précédemment après digestion par l' α -amylase, ces données confirment l'implication des α (1-4) glucanes dans la cohésion des granules des deux réacteurs.

Les contraintes hydrodynamiques appliquées sur les granules provoquent également de forts relargages de matière organique sur les granules digérés par la savinase. En effet, selon la figure 88, dans le cas des granules de R1, la turbidité de la phase MiTHy est 2,9 fois supérieure pour les granules digérés par la savinase que pour les granules incubés dans le PBS et dans le cas des granules de R2, elle est 2,5 fois plus importante. De même, selon la figure 87, le traitement par la savinase entraîne une augmentation importante du relargage de matière volatile soluble (phase SoTHy) lors des contraintes hydrodynamiques. En revanche, ce qui distingue le traitement pas la savinase de celui par l' α -amylase, c'est que la savinase ne semble pas provoquer le relargage de particules si on compare à la référence PBS, on n'observe pas d'augmentation significative des taux de transferts vers les phases MiTHy et MaTHy (figure 87). Bien que le comportement des protéines apparaisse différent de celui des α (1-4) glucanes, ces résultats, montrent que le rôle des protéines dans la cohésion des granules est également important.

Dans le cas des granules du réacteur R2 uniquement, outre l'effet sensible de ces deux enzymes, les mesures de turbidité mettent en évidence une certaine efficacité de la cellulase qui provoque une augmentation de la turbidité d'un facteur 1,8 par rapport à la référence incubée dans le tampon pH 5 (figure 88.B). De même, l'alginate lyase provoque une augmentation de la turbidité d'un facteur 1,3 et le lysozyme entraîne une augmentation de la turbidité d'un facteur 1,5 par rapport à la référence incubée dans le PBS. Les β (1-4) glucanes, les alginates et glycosaminoglycanes, même présents en quantités modérées, ont donc peut-être un rôle dans la cohésion des granules, et en particulier de ceux du réacteur R2. Il est possible, notamment, que ces types de polymères soient plus représentés au sein des filaments bactériens observés en surface des granules du réacteur R2 et qui sont totalement absents des agrégats de R1.

Les digestions effectuées sur les granules de R2 semblent avoir moins d'effet sur la perte de cohésion et le transfert de matière que sur les granules de R1. Ceci peut être imputé aux filaments observés en surfaces de ces agrégats qui vont se détacher facilement des granules sans nécessité d'action d'enzymes pendant les étapes de contraintes hydrodynamiques. Ces filaments vont constituer des masses importantes dans les fractions micro et macro particulaires qui vont perturber les observations et empêcher de conclure sur les effets des enzymes.

I.2.3. Transfert de cations divalents

Afin de compléter l'évaluation des effets des enzymes sur la résistance aux contraintes hydrodynamiques, le relargage de calcium dans la phase micro particulaire (phase MiTHy + SoTHy) a aussi été analysé. Ainsi, on remarque sur la figure 89, que les relargages de calcium après contraintes hydrodynamiques sont faibles en comparaison de ceux obtenus après digestion enzymatique seule (figure 84). Il est probable que les contraintes hydrodynamiques appliquées sur les granules ne provoquent pas de libération supplémentaire de calcium en provenance des agrégats. En effet, la diffusion de cet ion vers la phase soluble a pu se faire en quasi-totalité dès l'étape de digestion de la matrice par les enzymes.

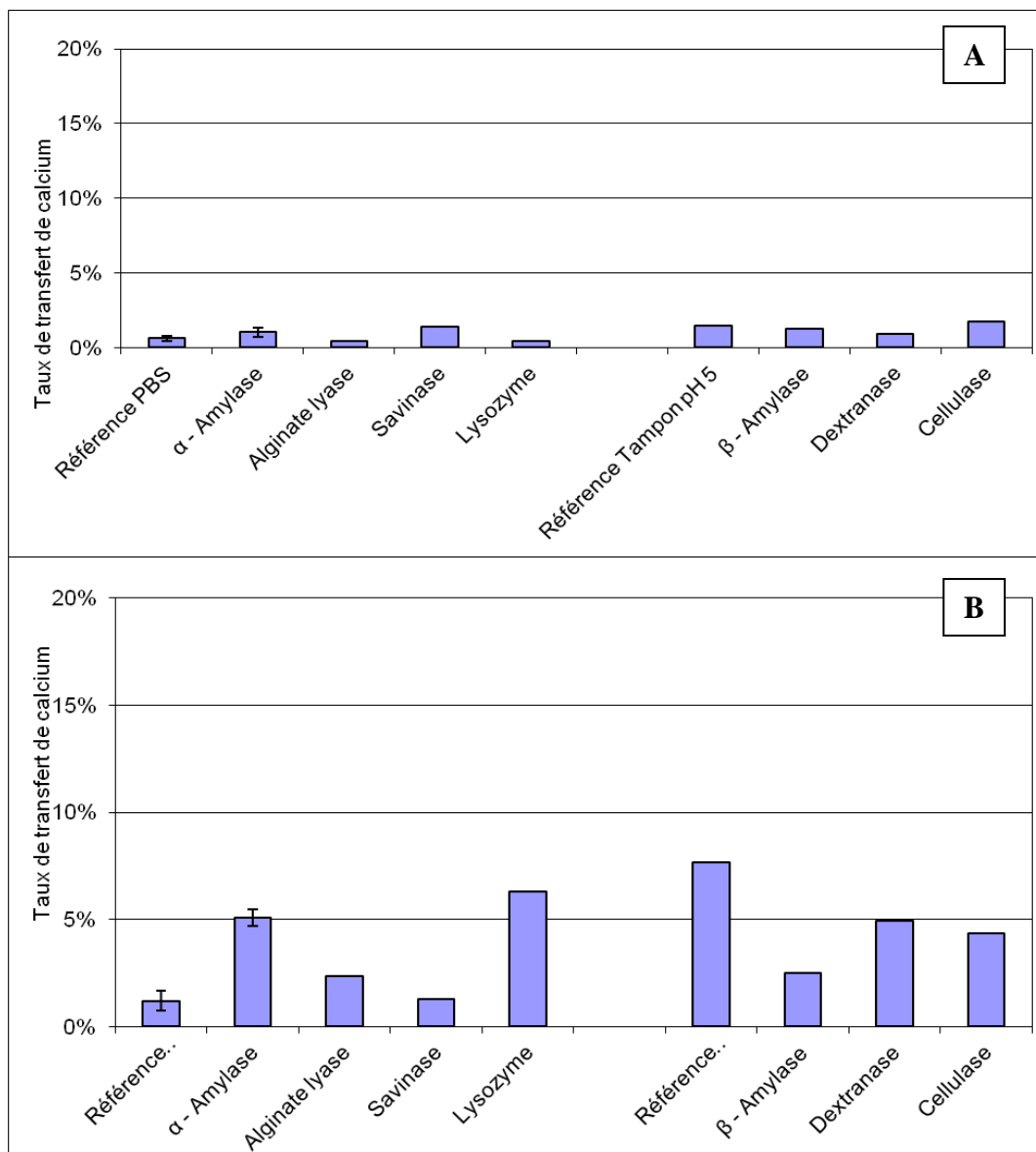


Figure 89 : Taux de transferts de calcium dans les phases MiTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL sur des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements enzymatiques. Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence dans le cas des digestions par l' α -amylase, l'alginate lyase, du lysozyme et de la savinase, et une incubation similaire dans du tampon pH 5 sert de référence dans le cas des digestions par la β -amylase, la dextranase et la cellulase.

I.3. Distribution des EPS après altération de la cohésion des granules

Parmi toutes les enzymes testées et selon les paramètres mesurés, l' α amylase est celle qui provoque la perte la plus importante de résistance aux contraintes. Afin de mieux comprendre comment les α (1-4) glucanes assurent leur rôle de cohésion, et, en particulier, pourquoi leur digestion provoque préférentiellement le relargage de particules de grandes tailles (macroparticules, phase MaTHy), nous avons choisi d'effectuer des observations confocales des granules digérés par l' α amylase (incubations de 24 h à 35 °C, sous agitation). Pour des questions de temps, on a choisi de restreindre l'étude à cette enzyme, et aux granules de R1.

Ces observations ont donc été effectuées sur les granules de R1 après contraintes hydrodynamiques afin de visualiser les effets des traitements par l' α amylase sur les distributions des EPS et des micro-organismes. De la même façon qu'au chapitre 3, les protéines ont été marquées par le FITC, les polysaccharides par la concanavoline A et l'ADN par le DAPI permettant ainsi de localiser les cellules. Le traitement d'images par le logiciel imageJ permet ensuite d'établir un profil moyen des marquages d'EPS et du DAPI entre la surface des agrégats et leur centre.

La figure 90 représente les marquages par la concanavoline A (combinés au marquage au DAPI) réalisés sur les granules digérés par l' α amylase et la figure 91 représente les marquages par le FITC (combinés au marquage au DAPI) réalisés sur les granules digérés par l' α amylase. Les résultats sont comparés aux mêmes expériences réalisées après une incubation similaire dans le PBS.

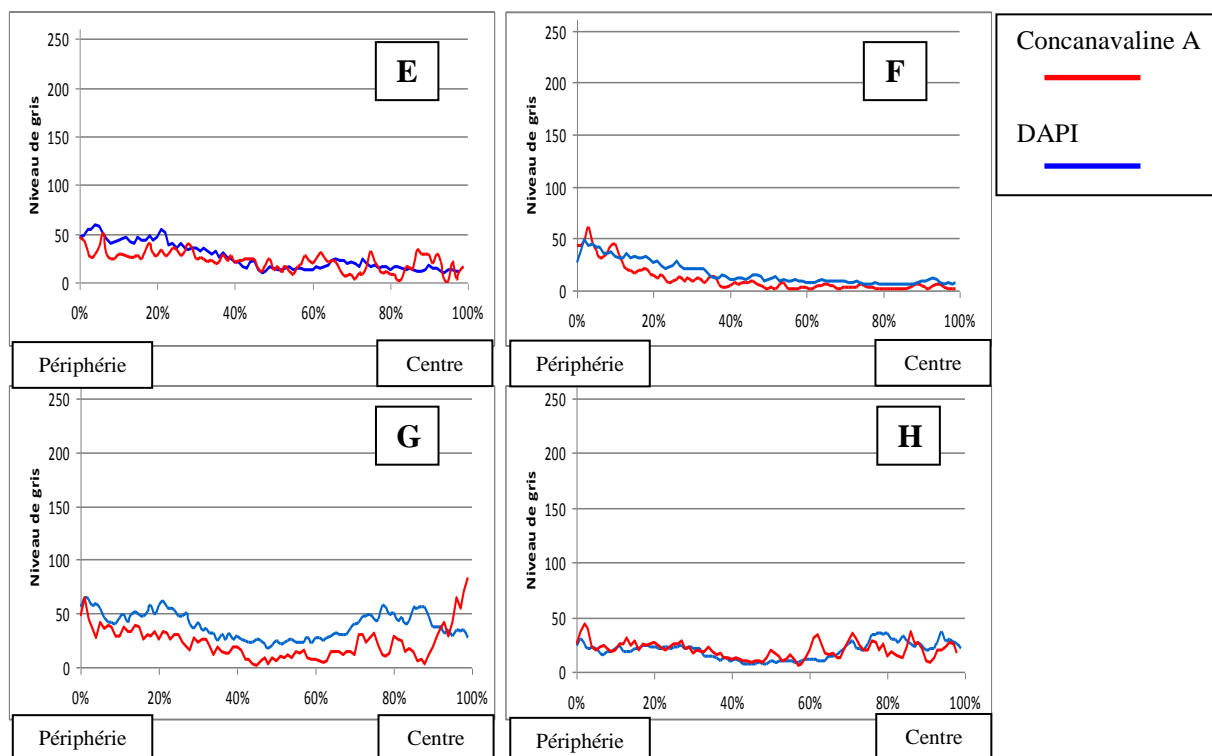
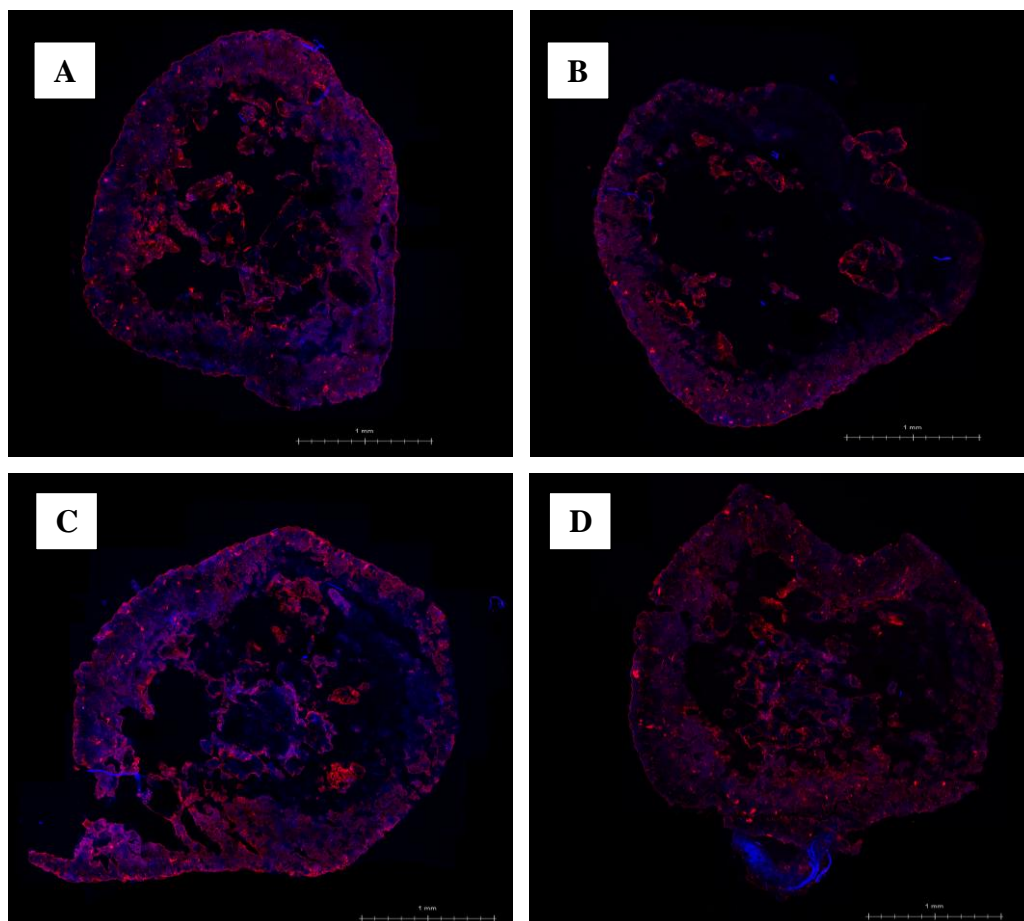


Figure 90 : Images en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupés par un cryomicrotome, et enfin marqués au DAPI en bleu et à la concanavaline A en rouge (A et B). Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence (C et D). Les courbes, effectuées à l'aide du programme ImageJ, représentent les profils d'intensité de marquage par la concanavaline A et le DAPI entre la périphérie et le centre des agrégats (E et F : granules digérés par l' α -amylase, G et H : référence PBS). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1).

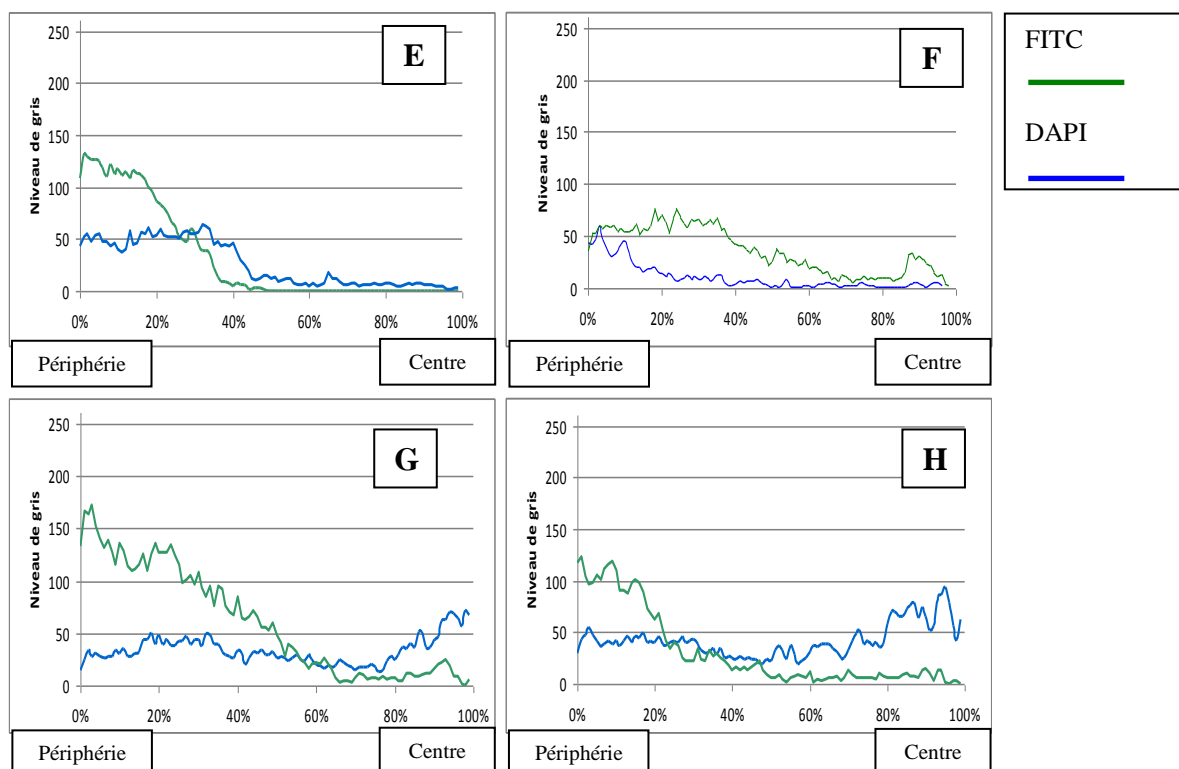
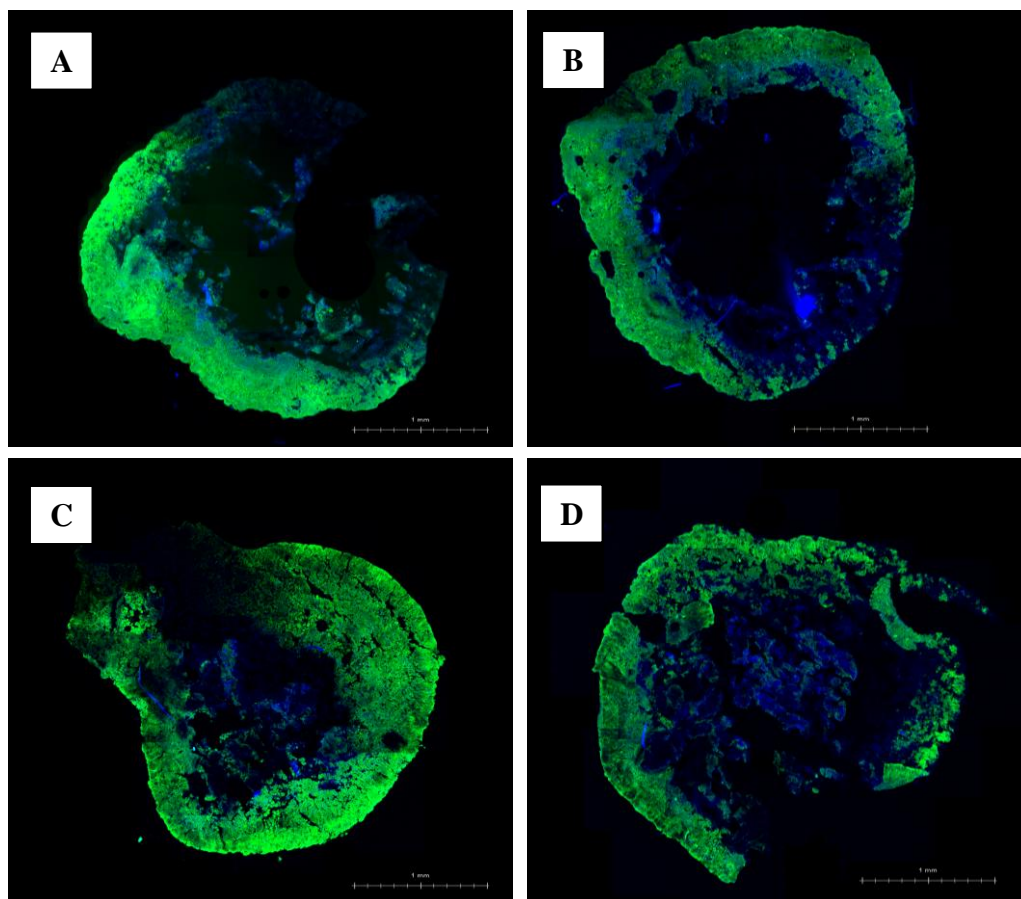


Figure 91 : Images vues en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupés par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et au FITC en vert (A et B). Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence (C et D). Les courbes, effectuées à l'aide du programme ImageJ, représentent les profils d'intensité de marquage par le FITC et le DAPI entre la périphérie et le centre des agrégats (E et F : granules digérés par l' α -amylase, G et H : référence PBS). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1).

Il est difficile de visualiser sur les images de la figure 90 une différence significative entre les marquages par la concanavaleine A des granules traités par le PBS (C et D) ou par l' α -amylase (A et B). Le marquage des résidus mannose et glucose semble s'atténuer très légèrement sous l'action de l'enzyme, cependant, cette atténuation ne se retrouve pas sur les graphiques de profils d'intensité de marquage (figure 90 E à H). Ceci peut s'expliquer par le fait que, les α (1-4) glucanes sont les seuls substrats de l' α amylase mais pas les seules cibles du marquage par la concanavaleine A. En effet, les résidus mannose et glucose marqués par cette lectine peuvent également être retrouvés dans de nombreux autres polysaccharides de type dextrane ou cellulose par exemple. Il est également envisageable que la concanavaleine A s'associe à d'autres types d'oses dérivés du glucose et du mannose. Par exemple, il est possible qu'elle se fixe à des dérivés chargés de ces deux oses comme les acides glucuroniques et mannuroniques que l'on retrouve dans des composés de type alginate.

On constate que le traitement des granules par l' α amylase ne provoque pas non plus de modification visible dans la répartition des EPS protéiques marqués par le FITC (figure 91). Nous avons vu que le protocole de digestion par l' α amylase provoque plutôt un relargage de macroparticules plutôt que de matière soluble. Le détachement de macroparticules consécutif à l'action de l'enzyme seule est difficile à évaluer lors de ces expériences car les granules ont été découpés en fines lamelles au cryomicrotome, ce qui a pu aussi abimer la structure par arrachement mécanique de particules.

Nous n'observons pas non plus d'atténuation particulière du signal du marquage DAPI. Cela confirme les mesures G6P-DH qui soutenaient que les traitements enzymatiques étaient sans incidence sur la population microbienne.

I.4. Rôles des différents types moléculaires d'EPS

Les digestions enzymatiques effectuées sur les deux réacteurs granulaires ont permis de montrer que plusieurs enzymes engendraient des altérations significatives des granules. La table 12 récapitule les résultats obtenus lors de ces expériences, et permet de voir quelles sont ces enzymes. D'après ces données, ce sont l' α -amylase et la savinase qui altèrent le plus les granules. En effet, ces deux enzymes provoquent toutes les deux un fort relargage de matière organique des granules issus des deux réacteurs. Ce relargage, visualisable par l'augmentation importante de la turbidité, a eu lieu à la fois sous l'action des enzymes seules ainsi qu'au cours des tests de contraintes hydrodynamiques. L'analyse plus poussée de la matière détachée montre que seul un traitement avec l' α -amylase permet le détachement de grosses particules (tailles comprises entre 315 μm et 2,82 mm) après digestion et traitement hydrodynamique des granules issus de R1. Ce dernier point laisse supposer que les α (1-4)-glucanes sont un élément indispensable à la cohésion des granules. Du moins qu'une extraction, même partielle, de ces fonctions polymériques semble pouvoir déstructurer la macro-structure des granules.

Dans le cas de la savinase, on constate que les digestions provoquent un relargage de colloïdes mais peu ou pas de détachement de particules car, dans le cas des deux réacteurs, l'enzyme n'augmente pas les masses de MV mesurées dans les phases micro et macroparticulaires (phases MiTHy et MaTHy). Par conséquent, si il apparaît nettement que les agrégats étudiés sont particulièrement riches en protéines, il semble difficile de les hydrolyser totalement ou en tout cas à un niveau suffisant pour mettre en péril l'intégrité des granules.

Table 12 : Bilan des effets des digestions enzymatiques sur les granules

	R1							R2						
	α - Amylase	β - Amylase	Dextranase	Cellulase	Alginate lyase	Savinase	Lysozyme	α - Amylase	β - Amylase	Dextranase	Cellulase	Alginate lyase	Savinase	Lysozyme
Effets des enzymes sur la matrice d'EPS des granules														
Détachement de particules	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Absorbance à 640 nm (turbidité)	++++	-	-	-	+	+++	-	+++	-	-	-	+	++	-
Calcium relargué dans la phase SoMiT	-	-	-	+++	-	+++	-	-	+	++	-	-	+++	-
Analyse de la cohésion des granules digérés par enzymes														
Mesures des tailles des agrégats	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Détachement de matière organique	MaThy	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MiTHy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SoTHy	++	-	-	++	+	++	-	+++	+	+	+	-	++
Absorbance à 640 nm (turbidité)	+++	-	-	-	-	++	-	+++	-	-	+	+	+++	+
Dosage Calcium relargué dans la phase MiTHy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

La digestion seule des agrégats par la savinase et l' α -amylase confirme donc la présence de protéines et polysaccharides au sein des matrices d'EPS qui avait été mise en évidence par les analyses des extraits obtenus avec le protocole multi-méthode (chapitre 3). Les tests de contraintes hydrodynamiques confirment maintenant le rôle de ces deux types de polymères dans la cohésion des agrégats granulaires. En 2009, Seviour et al. (2009a) étaient parvenus à des conclusions similaires dans le cas de leurs granules dont les modules d'élasticité s'effondraient lors de digestion par une α amylase ou une protéase. En revanche, les agrégats granulaires de Adav et al. (2008), se disloquaient sous l'effet de l' α amylase, mais ne réagissaient pas du tout à l'action de protéases.

Un autre élément de ces expériences vient différencier le comportement de ces deux types de polymères dans les granules. En effet, lors des dosages de calcium, il apparaît que les protéines sont fortement associées aux ions calcium alors que ce n'est pas le cas des α (1-4) glucanes, puisque contrairement à la savinase, la digestion par l' α -amylase ne provoque pas d'augmentation du relargage de calcium dans le milieu liquide. On peut déduire de cela une divergence dans les mécanismes d'attachement de ces deux types moléculaires. Les protéines seraient reliées les unes aux autres par des interactions ioniques mettant en jeu des pontages par des ions calcium. Les α (1-4) glucanes n'étant pas liés à des ions calcium, leur attachement à la matrice d'EPS est d'une autre nature : interactions de type Van der Waals ou ponts hydrogène.

D'après ces différences importantes de comportement de ces deux types moléculaires, on peut supposer qu'ils sont engagés dans deux différentes structures génératrices de cohésion. Ces deux structures semblent relativement indépendantes car le démantèlement de l'une n'entraîne pas celui de l'autre. En effet, lorsque l'on détruit les structures polysaccharidiques par action d'une α -amylase, on ne provoque pas le relargage des ions calcium contenus dans les structures protéiques. Ces deux types de structures sont probablement composés majoritairement respectivement de protéines et de glucanes. Cependant, il est possible qu'elles contiennent d'autres espèces chimiques plus ou moins représentées et aux fonctions plus ou moins importantes. Leur composition exacte peut également varier entre les granules des deux réacteurs.

Il est à noter que suite à ces expériences, des tests G6P-DH ont été réalisés sur les milieux liquides issus des digestions enzymatiques seules et des granules ayant subi les expériences de contraintes hydrodynamiques. Ces tests s'étant tous révélés négatifs, on peut en déduire que l'action des enzymes et des contraintes hydrodynamiques telles que nous les avons menées n'ont pas d'incidence sur la viabilité cellulaire.

II. Etude des fonctions chimiques impliquées dans l'agrégation

II.1. Effets de traitements chimiques

Le but est ici de déstabiliser certaines interactions chimiques afin d'évaluer leur importance dans la cohésion des agrégats étudiés. Suite aux résultats obtenus précédemment (extractions d'EPS anioniques, relargage de calcium), les agents chimiques utilisés ont été choisis afin de déstabiliser spécifiquement des interactions de type ioniques. Des incubations ont été effectuées dans de l'EDTA un chélateur de cations divalents afin de mesurer l'importance des ions calcium dans les propriétés physiques des agrégats granulaires. Nous avons également mis les granules en présence de NaCl concentré à 0,5 M (soit environ trois fois la concentration isotonique) dans le but d'établir une compétition entre les ions sodium et les ions calcium dans l'établissement de liaison ioniques.

Les granules ont été mis en incubation dans ces solutions pendant 24 h, à 35 °C sous agitation. Suite à cette incubation, les agrégats sont tamisés à l'aide d'un tamis de 315 μ m. Le retentât composé de granules resté entiers et des particules les plus grosses (phases granulaires et macroparticulaires) sera utilisé pour mesurer l'impact des traitements sur la résistance à des contraintes hydrodynamiques. Le déroulement de ce protocole est détaillé dans la figure 92.

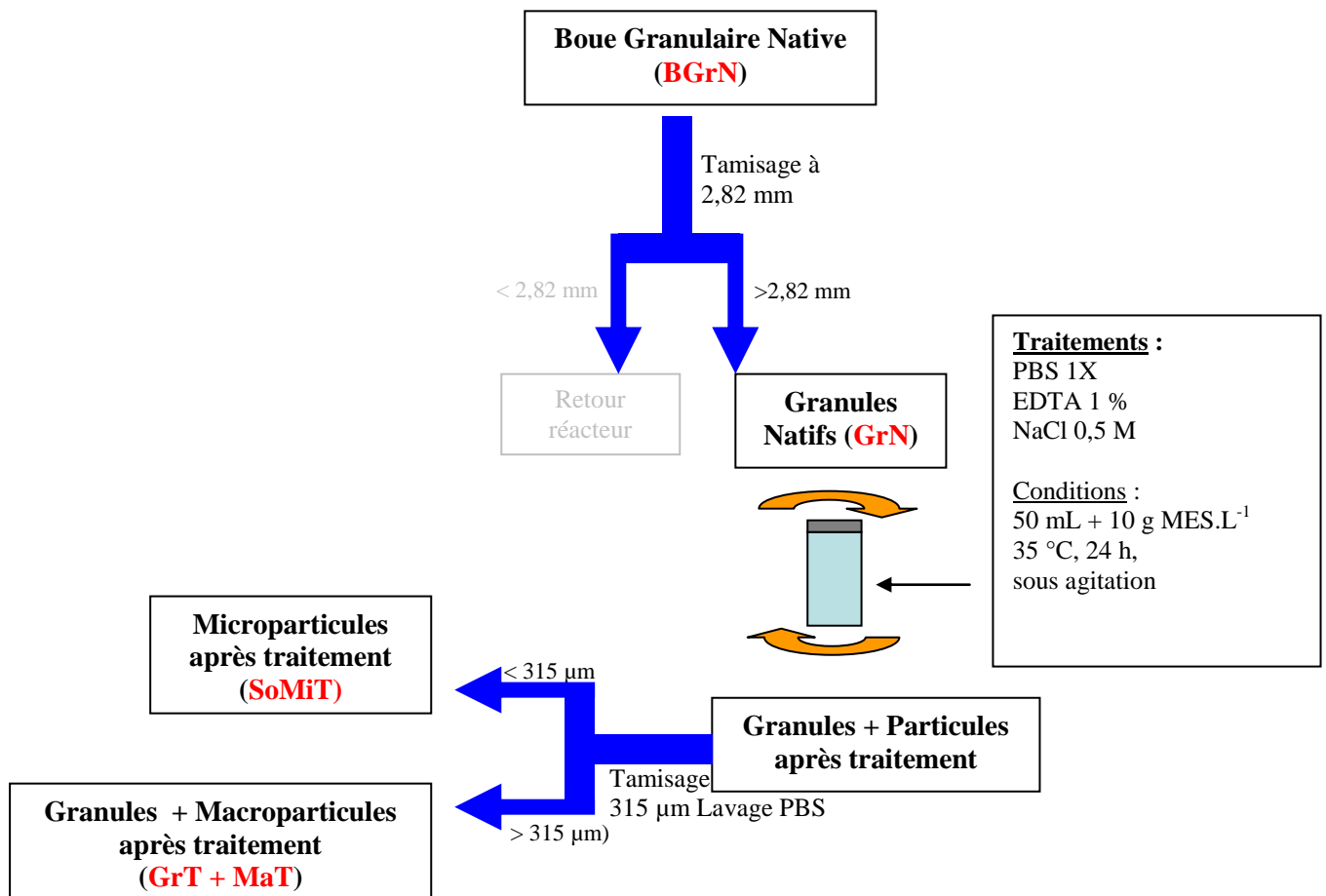


Figure 92 : Protocole utilisé pour les traitements chimiques des granules.

La mesure des masses de MV relarguées par les granules lors de ces expériences ainsi qu'une mesure de turbidité par absorbance à 640 nm et un dosage de calcium seront effectués sur le tamisât (Phase SoMiT). Ces résultats sont évalués par comparaison avec des granules ayant subi une incubation identique dans du tampon PBS 1 X.

II.1.1. Transfert de matière organique

Comme dans le cas des traitements enzymatiques, les valeurs de masses de MV ont été mesurées dans les tamisâts à 315 µm après les traitements chimiques mais nous n'avons pas pu utiliser ces mesures à cause des interférences dues aux concentrations importantes des agents chimiques.

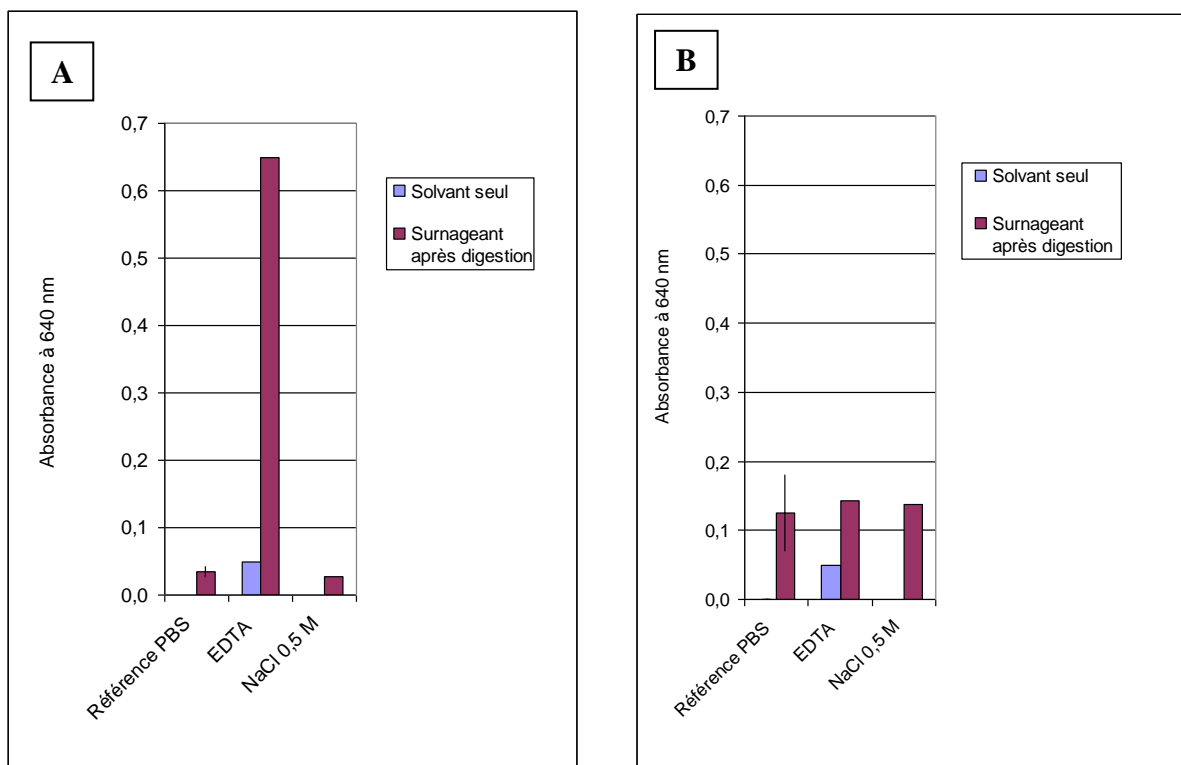


Figure 93 : Absorbances à 640 nm phases SoMiT prélevées après traitements chimiques des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B): incubation dans du tampon tris EDTA 1 %, et dans du NaCl 0,5 M. Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence. Avant chaque mesure, les échantillons liquides sont laissés à décanter pendant 10 min afin de stabiliser les mesures.

En ce qui concerne la de mesure de turbidité par l'absorbance à 640 nm, les résultats de la figure 93 montrent que les granules de R2 sont peu sensibles aux traitements chimiques auxquels ils sont soumis. En revanche, les granules de R1 semblent générer beaucoup de turbidité lorsqu'ils sont mis en contact avec de l'EDTA à une concentration de 1 %. Par rapport à la référence PBS, on observe en effet une augmentation d'un facteur 19,0 de la mesure d'absorbance. Ceci est totalement cohérent avec les résultats d'extraction que nous avons obtenus et qui mettaient particulièrement en évidence l'efficacité de l'étape utilisant l'EDTA (à une concentration de 2 %).

II.1.2. Transfert de cations divalents

Les résultats de mesures de concentration en calcium dans ces surnageants montrent également l'efficacité des traitements par l'EDTA 1 %. Par rapport au traitement PBS qui sert de référence, les incubations de 24 h dans l'EDTA permettent d'augmenter les quantités de calcium relargué par les granules de R1 d'un facteur 78 et les quantités de calcium relargué par les granules de R2 d'un facteur 31 (figure 94).

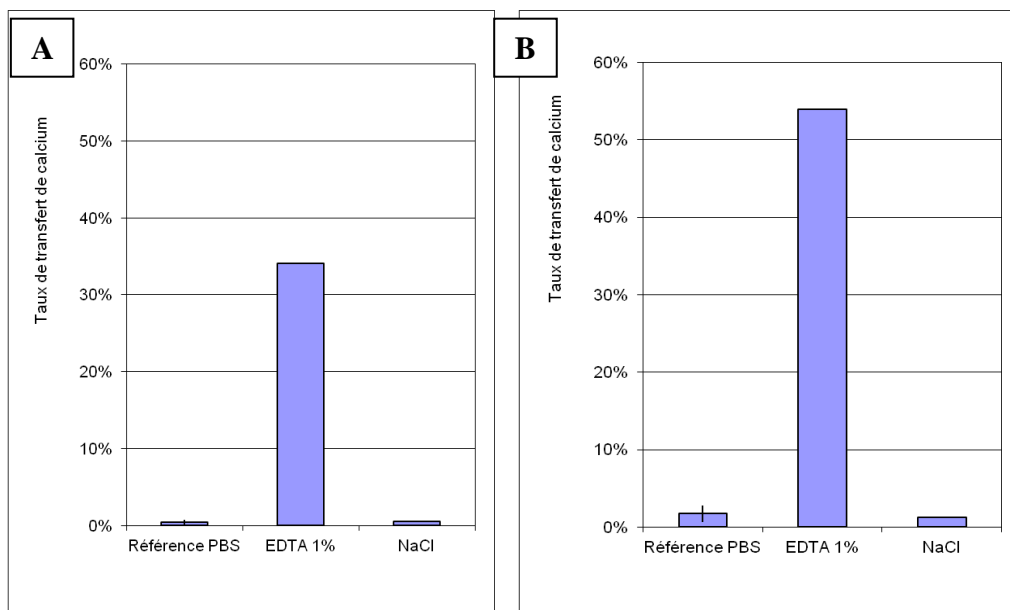


Figure 94 : Taux de transfert de calcium dans les phases SoMit prélevées après traitements chimiques des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B): incubation dans du tampon tris EDTA 1 %, et dans du NaCl 0,5 M. Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence.

L'EDTA étant un chélateur de cations divalents, les quantités de calcium mesurées ici, correspondent tout simplement aux ions complexés et évacués des granules. Le traitement à l'EDTA est donc bien efficace, au vu de ces résultats. On peut en déduire que les pertes de matières observée sur la figure 93, sont bien liés au départ des cations divalent de la matrice d'EPS.

II.2. Effets des traitements chimiques sur la résistance au détachement des granules

Comme dans le cas des digestions enzymatiques, les contraintes hydrodynamiques sont imposées par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL des granules entiers (phases GrT et phases MaT) prélevés par tamisage à 315 μm . Par la suite, les fragments d'agrégats résultants sont séparés en plusieurs fractions par une série de tamisages similaires à ceux pratiqués sur les granules ayant subi des digestions enzymatiques (figure 85). Il est à noter que suite à ces expériences, des tests G6P-DH ont été réalisés sur les milieux liquides issus des traitements chimiques seuls et des granules ayant subi les expériences de contraintes hydrodynamiques. Ces tests s'étant tous révélés négatifs, on peut en déduire que l'action des traitements chimiques et des contraintes hydrodynamiques telles que nous les avons menées n'ont pas eu d'incidence sur la viabilité cellulaire.

II.2.1. Effet sur la taille des granules

Nous avons mesuré les effets des contraintes hydrodynamiques sur les diamètres des granules soumis aux traitements chimiques par l'EDTA et le NaCl. Ces mesures sont effectuées sur les phases granulaires uniquement (GrTHy, tailles supérieures à 2,82 mm). La figure 95 présente les distributions de tailles de granules ainsi que les représentations en boîtes à moustaches des diamètres des granules traités.

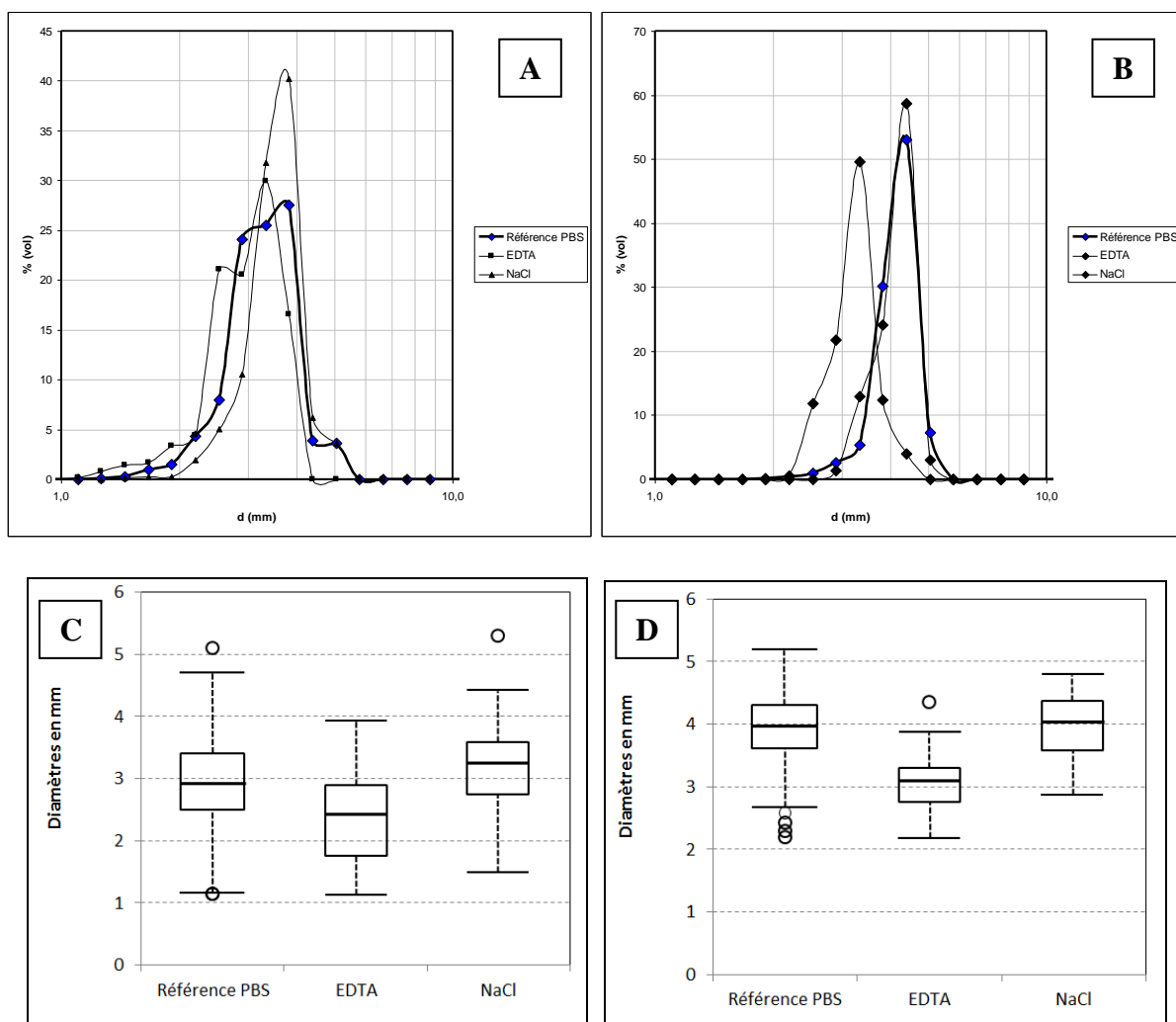


Figure 95 : Distribution des diamètres des granules de la phase GrTHy prélevés après application de contraintes hydrodynamiques sur les granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements chimiques et représentation en boîtes à moustaches des répartitions des diamètres pour les réacteurs R1 (C) et R2 (D). Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence. La barre horizontale en gras à l'intérieur de chaque boîte à moustaches représente la valeur de diamètre médian. Les bords hauts et bas de la boîte représentent respectivement les 3èmes et 1ers quartiles. Les traits horizontaux aux bouts des lignes pointillées représentent les valeurs maximales et minimales des diamètres mesurés à l'exclusion de certaines valeurs exclues. Les valeurs exclues de cette représentation sont les valeurs à une distance de la valeur médiane deux fois et demi supérieure à l'écart entre le 1er et le 3ème quartile. Ces valeurs sont représentées par des cercles sur le graphique.

D'après cette figure, une incubation dans le NaCl ne provoque pas de baisse significative des diamètres des granules. Ce n'est pas surprenant sachant que ce traitement seul n'a pas apporté de modifications mesurables.

En revanche, aussi bien dans le cas de R1 que de R2, on note une forte diminution des diamètres des granules lors des contraintes hydrodynamiques lorsqu'ils ont été mis présence d'EDTA 1 % (en comparaison avec la référence incubée dans le tampon PBS). Les interactions ioniques basées sur le pontage par des ions calcium a donc un rôle important dans la cohésion des granules étudiés.

II.2.2. Transfert de matière organique

La figure 96 représente les parts de MV représentées par les fractions macro particulières et micro particulières (phases MaTHy, MiTHy et SoTHy) obtenues après contraintes hydrodynamiques. Afin de confirmer ces conclusions, nous avons également effectué des mesures de turbidité dans le milieu liquide (phases MiTHy + SoTHy) suite aux contraintes hydrodynamiques (figure 97).

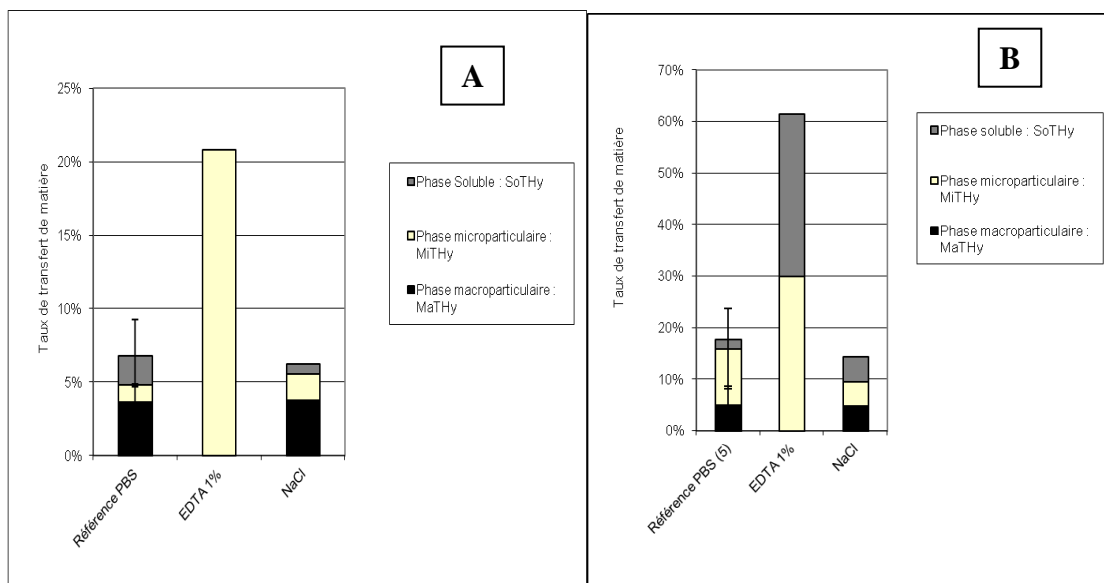


Figure 96 : pourcentages massiques des matières volatiles totales contenues dans SoTHy, MiTHy et MaTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL sur des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements chimiques: incubation dans du tampon tris EDTA 1 %, et dans du NaCl 0,5 M. Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence.

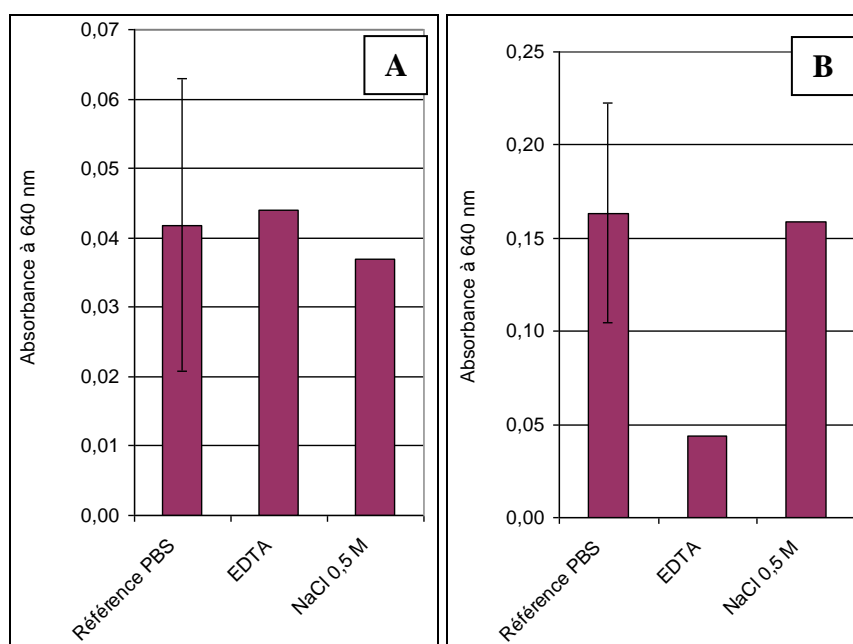


Figure 97 : Absorbances à 640 nm des phases SoTHy + MiTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL sur des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements chimiques: incubation dans du tampon tris EDTA 1 %, et dans du NaCl 0,5 M. Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence. Avant chaque mesure, les échantillons liquides sont laissés à décanter pendant 10 min afin de stabiliser les mesures.

D'après les mesures de transferts de matière organique (figure 96), on constate que l'EDTA ne génère aucune phase macroparticulaire (l'altération correspond en fait à une dissolution de la surface du granule sans rupture observée). En revanche, la phase microparticulaire augmente radicalement, d'un facteur 20,8 dans le cas des granules de R1 et d'un facteur 3,9 dans le cas des granules de R2. Selon ces mesures, dans le cas du réacteur R1, aucune augmentation de masse de MV n'est observée pour la phase SoTHy, mais dans le cas du réacteur R2, la masse de MV transférée dans cette phase augmente très fortement. Cette différence peut sans doute être imputée aux filaments présents à la surface des granules de ce réacteur.

En revanche, selon la figure 97, l'ensemble des absorbances à 640 nm observées à la suite des contraintes hydrodynamiques effectuées sur des granules traités chimiquement sont très faibles et non significativement différentes des références PBS. Ceci suppose que la matière organique transférée détachée des granules lors des contraintes hydrodynamiques et transférée dans les phases MiTHy et SoTHy est intégralement décantable. Dans le cas du réacteur R1, ceci est cohérent avec le fait qu'aucune matière n'est transférée dans la phase SoTHy. Dans le cas du réacteur R2, la matière organique transférée dans cette phase, et vraisemblablement issue des filaments des granules considérés est donc composée de matériel dense.

Selon ces résultats, les effets de l'EDTA sur la structure des granules sont donc très importants car ils ne provoquent pas un simple affaiblissement de la cohésion des granules qui aurait provoqué une baisse de la résistance au détachement de particule, comme dans le cas de certaines enzymes et notamment de l' α -amylase (figure 88), mais une dissolution des composants de la matrice qui vont se disperser sous l'action des contraintes hydrodynamiques.

II.2.3. Transfert de cations divalents

On réalise également la mesure des quantités de calcium relarguées suite aux contraintes hydrodynamiques (figure 98).

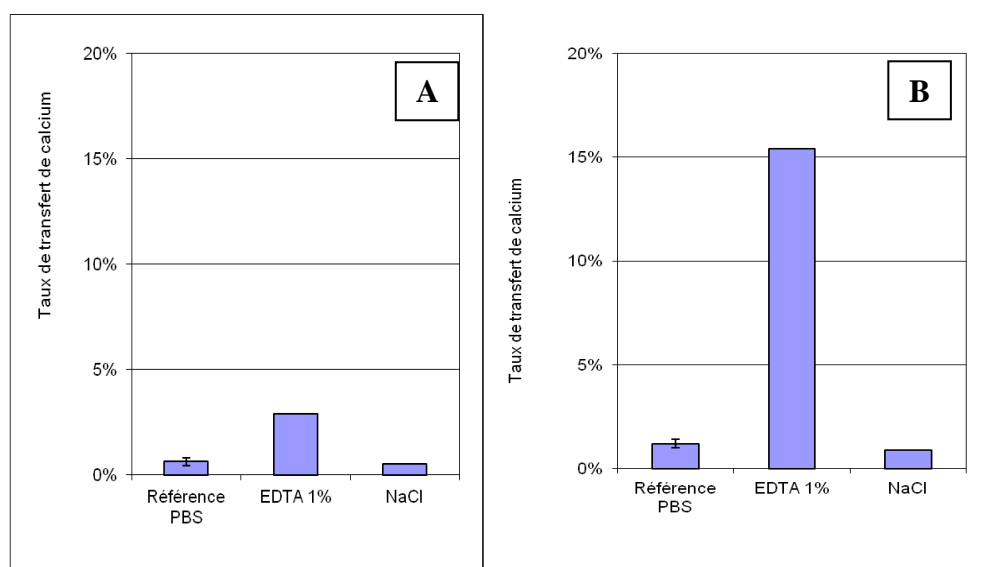


Figure 98 : Taux de transfert de calcium dans phases MiTHy prélevées après application de contraintes hydrodynamiques par agitation à 550 rpm par une hélice plate de 2 cm de diamètre dans une cuve de 100 mL sur des granules des réacteurs R1 (A) et R2 (B) ayant subi des traitements chimiques: incubation dans du tampon tris EDTA 1 %, et dans du NaCl 0,5 M. Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence.

Le relargage de calcium est assez modéré dans le cas de R1 (augmentation de 58 % de la quantité de calcium relargué, par rapport à la référence PBS) et plus fort dans le cas de R2 (augmentation d'un facteur 9,7 par rapport à la référence PBS). Ces mesures confirment l'efficacité de l'EDTA 1 % pour la déstructuration des granules étudiés.

II.2.4. Distribution des EPS après altération de la cohésion des granules

L'étude de la structure cohésive protéique de la matrice des granules a été faite par des observations microscopiques confocales réalisées après contraintes hydrodynamiques sur des granules traités par de l'EDTA 1 % (incubation de 24 h à 35 °C, sous agitation).

La figure 99 représente les marquages par le FITC (combinés aux deux marquages FISH et au DAPI) réalisés sur ces granules traités par l'EDTA 1 %.

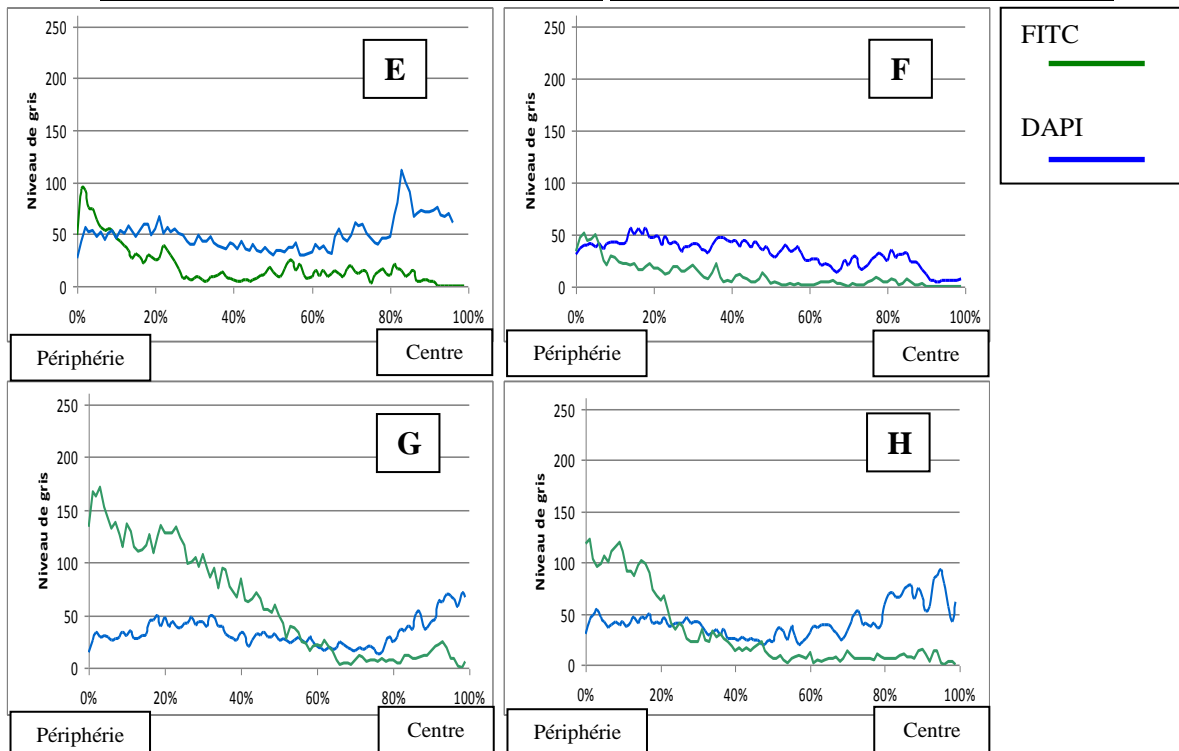
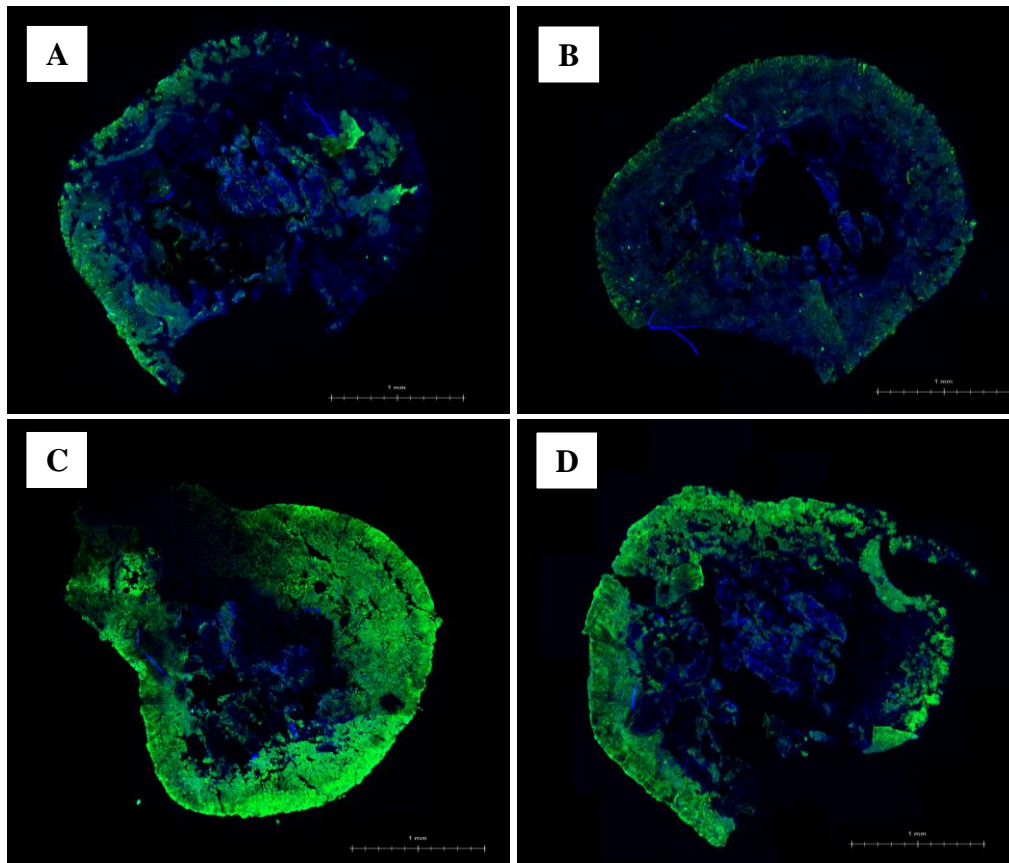


Figure 99 : Images vues en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupés par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et au FITC en vert (A et B). Une incubation similaire dans du tampon PBS 1X sert de référence (C et D). Les courbes, effectuées à l'aide du programme ImageJ, représentent les profils d'intensité de marquage par le FITC et le DAPI entre la périphérie et le centre des agrégats (E et F : granules digérés par l' α -amylase, G et H : référence PBS). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe 1).

Ces observations microscopiques montrent bien l'efficacité de ce traitement qui a abouti à la disparition quasi-totale des protéines marquées par le FITC (figure 99 A à D). Cette disparition est également très bien mise en évidence par les profils d'intensité de marquage puisque l'on observe sur les figures 99.E et 99. F, un abaissement important des intensités de marquage par rapport aux témoins de la figure 99.G et 99.H. Cela confirme bien notre hypothèse selon laquelle les protéines forment une structure cohésive basée sur le pontage par le calcium.

En revanche, comme dans le cas des digestions par l' α amylase, aucune altération des populations microbiennes visualisées par les marquages au DAPI n'est mise en évidence sur ces images. Cela est en accord avec les tests G6P-DH effectués (chapitre 4, paragraphe 1).

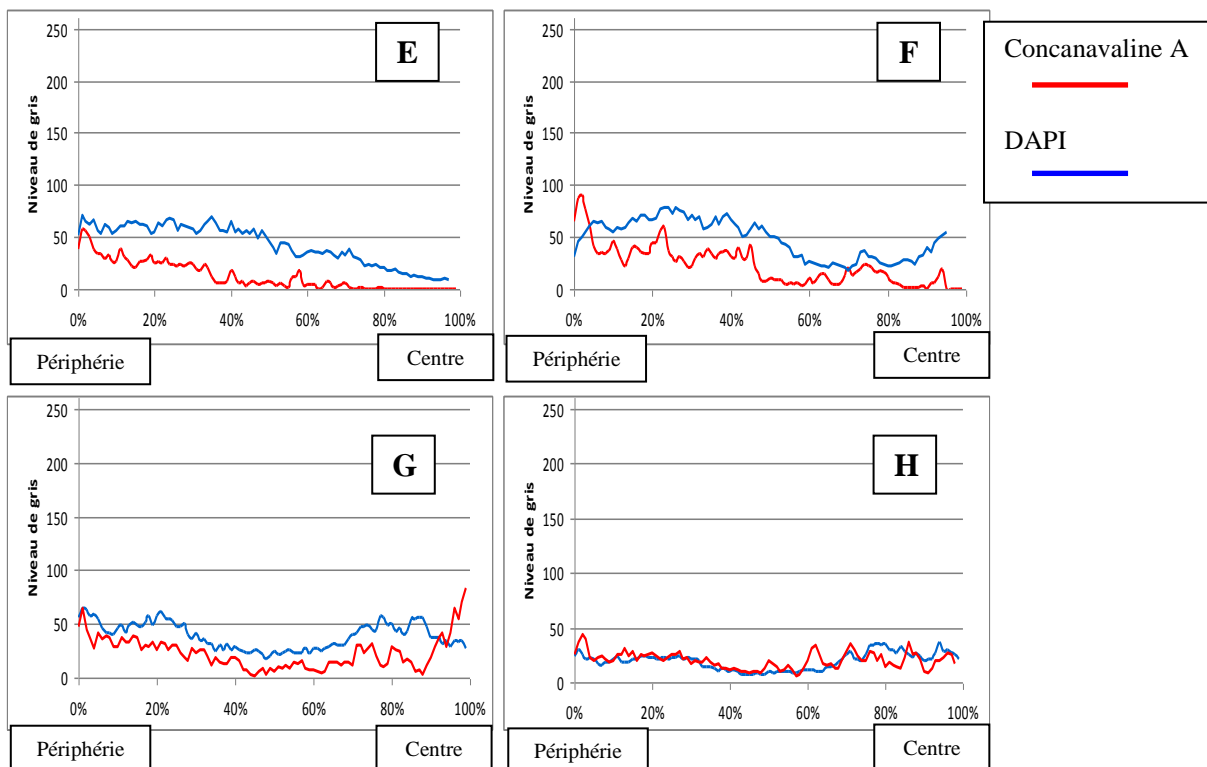
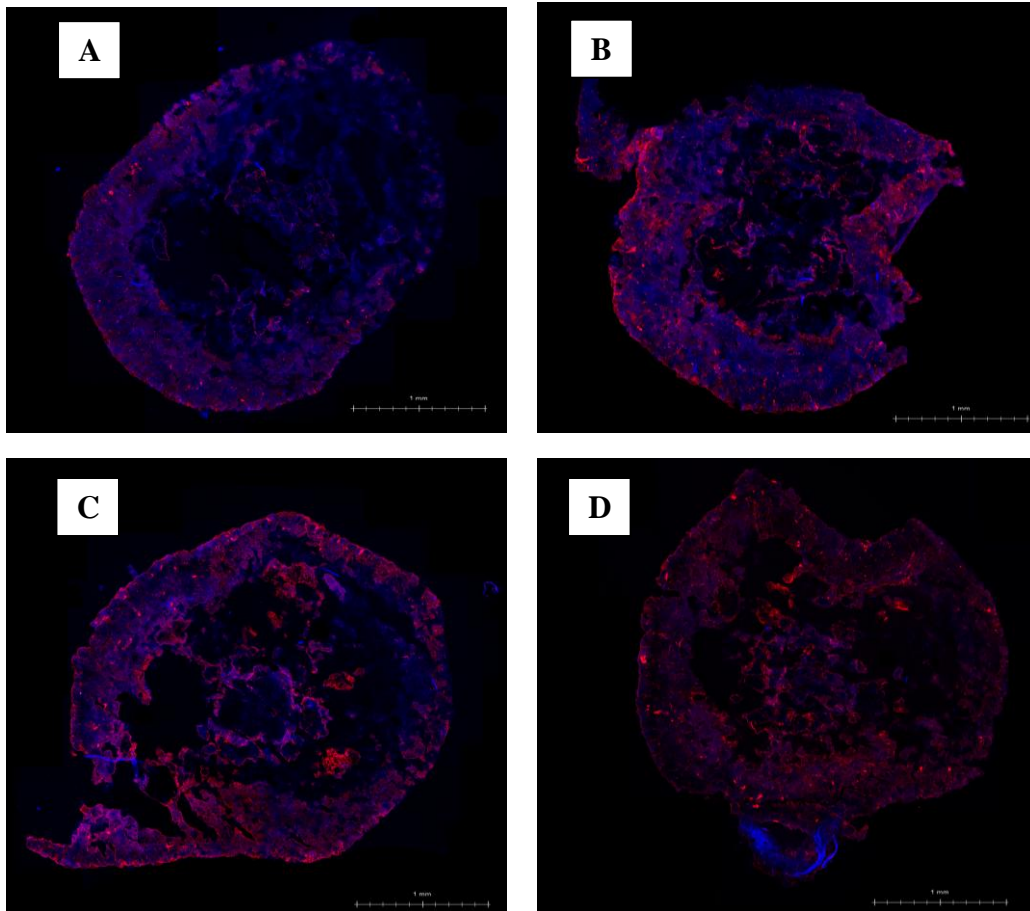


Figure 100 : Images vues en microscopie confocale de granules de R1 incubés 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupés par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et à la concanavaline A en rouge (A et B). Une incubation similaire dans du tampon PBS IX sert de référence (C et D). Les courbes, effectuées à l'aide du programme ImageJ, représentent les profils d'intensité de marquage par la concanavaline A et le DAPI entre la périphérie et le centre des agrégats (E et F : granules digérés par l' α -amylase, G et H : référence PBS). (Les images sont présentées en agrandissement en annexe I).

La figure 100 représente les marquages par la concanaviline A (combinés aux marquages au DAPI) réalisés sur ces granules traités par l'EDTA 1 %. Ces images et ces profils de marquages, nous montrent que les traitements par l'EDTA 1 % n'ont pas d'incidence particulière sur la localisation des polysaccharides contenant des résidus glucose et mannose marqués par la concanaviline A. Les altérations pourtant très intenses des structures cohésives protéiques n'ont donc pas eu d'incidence sur les structures polysaccharidiques confirmant leur probable indépendance l'une par rapport à l'autre.

Là encore, aucune altération des populations microbiennes visualisées par les marquages au DAPI n'est mise en évidence sur ces images.

II.3. Rôle des interactions ioniques et du pontage calcium

L'analyse des conséquences du traitement par l'EDTA confirme le rôle prépondérant des interactions ioniques et en particulier du pontage calcium dans la cohésion des granules et leur résistance au détachement.

Au sein de cette matrice, certains polymères possédant des charges anioniques forment donc vraisemblablement une structure de type gel par association avec ces cations divalents, et cette structure apparaît comme fondamentale pour le maintien de l'intégrité physique des agrégats.

Etant donné les résultats obtenus avec les digestions enzymatiques, il est probable que au moins une partie importante de ces polymères anioniques soient de nature protéique. En effet, nous avons vu lors de ces expériences que l'hydrolyse des protéines par la savinase provoquait le relargage massif d'ions calcium. Cette hypothèse est également en accord avec les analyses par chromatographie d'échange d'anions des EPS extraites qui montrent que les EPS protéiques des granules sont caractérisées par des charges négatives élevées au pH de fonctionnement des réacteurs (Chapitre 4, figure 13). Elle est en outre d'autant plus probable que selon les résultats d'extraction, les protéines constituent le composé majoritaire des EPS.

En revanche, il est peu probable que les α (1-4) glucanes soient directement impliqués dans la cohésion de cette structure via des liens de type « ponts ioniques » car les déstructurations des agrégats par l' α -amylase ne provoquent pas de relargage de calcium. Par conséquent, au sein des granules que nous étudions, on peut penser qu'il existe deux structures cohésives distinctes. L'une constituée majoritairement de protéines reliées entre elles par des interactions ioniques dans lesquelles le pontage par des ions calcium est très impliqué, et l'autre, contenant majoritairement des α (1-4) glucanes, et dont la cohésion repose sans doute davantage sur l'établissement de liaison H et d'interactions de Van der Waals. Ceci concorderait en outre avec les observations microscopiques des coupes de granules effectuées en chapitre 3 (figures 90, 91, 92 et 93) qui montrent que les localisations des protéines et des polysaccharides ne sont pas les mêmes dans les granules que nous étudions.

Suite à ces expériences de digestions enzymatiques et traitements chimiques des granules, on conclut que trois traitements sont à même de générer des pertes de matière organique lorsque les granules sont soumis à des contraintes hydrodynamiques. Il s'agit des traitements par l' α -amylase, par la savinase, et par l'EDTA. Ces résultats de transferts de matières organiques et de calcium sont récapitulés dans la table 13 et ceci pour les réacteurs R1 et R2.

Table 13 : Bilan des effets des digestions enzymatiques sur les granules

	R1						R2					
	α - Amylase	Cellulase	Alginate lyase	Savinase	EDTA	NaCl	α - Amylase	Cellulase	Alginate lyase	Savinase	EDTA	NaCl
Effets des enzymes sur la matrice d'EPS des granules												
Détachement de particules	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Absorbance à 640 nm (turbidité)	++++	-	+	+++	++++	-	+++	-	+	++	-	-
Calcium relargué dans la phase SoMiT	-	+++	-	+++	++++	-	-	-	-	+++	++++	-
Analyse de la cohésion des granules digérés par enzymes												
Mesures des tailles des agrégats	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++	-
Détachement de matière organique	MaThy	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MiThy	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	++	-
	SoThy	++	++	+	++	-	-	+++	+	-	++	++
Absorbance à 640 nm (turbidité)	+++	-	-	++	-	-	+++	+	+	+++	-	-
Dosage Calcium relargué dans la phase MiThy	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+++	-

Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'existence de deux structures distinctes toutes deux génératrices de cohésion. La première, dont les composés majoritaires sont des polysaccharides contenant des liaisons glucoses – glucose en α (1-4), comme le montrent les observations en microscopie confocale détaillées dans le chapitre 3, figures 90 et 92, forme des gangues assez fines, mais très compactes, autours de certaines microcolonies de cellules. L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre tend à démontrer que cette structure est indispensable à la cohésion car sa lyse enzymatique par une α amylase aboutit à des pertes de matière des granules et à un abaissement sensible de la résistance des agrégats aux contraintes hydrodynamiques. En particulier dans le cas des granules de R1, on remarque que cette lyse enzymatique aboutit lors des contraintes hydrodynamiques à la libération de particules de taille importante (MaTHy). Il est probable que lors de ces traitements, les matières libérées correspondent au contenu des gangues de polysaccharides. En effet, il est vraisemblable que, suite à la digestion de la gangue polysidique par l' α amylase, ce contenu, composé de cellules et de matrice d'EPS, soit très facilement détaché des agrégats. Cette importance des α (1-4) glucanes dans la résistance physique des granules est également soulignée par les travaux de Seviour et al. (2009a) et Adav et al. (2008) dans le cas de leurs granules.

Les expériences que nous avons menées n'ont pas permis de démontrer avec certitude quelles sont les interactions chimiques à l'origine de la cohésion de cette gangue de polysaccharides. Etant donnée les propriétés générales de glucanes, il est peu probable qu'il s'agisse de liaisons hydrophobes ou de liaisons ioniques fortes. Il est donc probable que les interactions reliant les α (1-4) glucanes de la matrice d'EPS soient de type Van der Waals et/ou Hydrogène.

Nous avons davantage d'informations sur les bases de la cohésion de la seconde structure. En effet, celle-ci est composée majoritairement de protéines reliées entre elles par des interactions ioniques reposant sur l'établissement d'un pontage calcium. En comparaison avec la structure polysaccharidique précédente, et d'après les images de microscopie confocale décrites dans le chapitre 3, la structure cohésive protéique est répartie de manière beaucoup plus homogène dans les agrégats. Cette matrice apparaît de manière très compacte à proximité des cellules et des microcolonies marquant leur présence de manière très nette sur les images de microscopie.

L'existence de cette structure est cohérente avec les données du chapitre 4 qui montrent que les protéines constituent le composé majoritaire des EPS des granules et qu'elles ont majoritairement de fortes charges anioniques au pH de fonctionnement des réacteurs. Comme le montrent les mesures de relargage de calcium consécutifs aux digestions des granules par de la savinase (figure 84), la structure protéique contient également une quantité importante d'ions calcium. Les expériences d'incubation dans l'EDTA révèlent en outre le rôle prépondérant de ces cations divalents dans la cohésion des granules. On remarque en particulier que contrairement aux autres traitements, l'utilisation de l'EDTA ne provoque pas de détachement de macroparticules de tailles comprises entre 315 μm et 2,82 mm (phase MaTHy), mais uniquement de microparticules de tailles comprises entre 1,5 μm et 315 μm (phase MiTHy). L'EDTA provoque donc une désagrégation plus importante que les enzymes.

Selon ces résultats, on peut supposer qu'un des mécanismes majeurs impliqué dans la cohésion des granules est le pontage par le calcium entre les nombreuses charges anioniques des protéines des granules. L'importance des interactions ioniques dans la structure des granules a déjà été mise en évidence par l'étude de Seviour et al. (2009a). Quant au rôle particulier des cations divalents, et notamment du calcium, il s'agit d'une hypothèse déjà émise pour expliquer l'agrégation des floes par Sobeck et Higgins (2002).

Les résultats de ce chapitre laissent donc penser que ces deux structures qui ont été identifiées sont indépendantes l'une de l'autre puisque le démantèlement de l'une ne provoque pas celui de l'autre. On peut le voir notamment sur la figure 91, où l'on voit que l'action de l' α -amylase lysant les α (1-4) glucanes, ne perturbe pas la structure protéique marquée par le FITC.

Si on considère l'organisation générale de ces deux structures cohésives l'une par rapport à l'autre dans les granules, on peut imaginer que la structure protéique, via le pontage calcium, joue un rôle structurant réparti de manière homogène assurant la cohésion des bactéries entre elles dans les colonies, alors que les α (1-4) glucanes assurent l'agglomération et l'adhésion des blocs de biofilm et de microcolonies en englobant ces macro ou micro-structures et en se positionnant plutôt à l'interface de celles-ci avec l'eau.

Les α (1-4) glucanes et les protéines sont les composés majoritaires de ces deux structures, cependant, il n'est pas du tout exclu que d'autres polymères y soient présents et y jouent un rôle significatif. D'autres investigations seront nécessaires pour creuser en particulier le rôle des β -glucanes et des sucres anioniques. Cela permettrait peut-être d'expliquer certaines de nos observations suite à l'action des enzymes telles que la cellulase ou l'alginate lyase.

Si on essaie de différencier les résultats obtenus avec les deux réacteurs, on s'aperçoit que le réacteur R1, plus fortement alimenté en azote, affiche une résistance généralement plus importante à la fois face aux enzymes et aux traitements chimiques mais aussi face aux contraintes hydrodynamiques. En outre, on remarque que les traitements appliqués libèrent préférentiellement des microparticules dans le cas de R2 alors qu'ils libèrent préférentiellement des macroparticules dans le cas de R1. Par conséquent, dans le cas de R1, l'application de contraintes hydrodynamiques suite aux traitements enzymatiques et chimiques provoque plutôt des phénomènes de détachement et de scission, alors que dans le cas de R2, on assiste plutôt à de l'érosion des agrégats. Ceci est probablement dû en partie à la présence des filaments en surface des granules de R2 qui se détachent facilement. C'est particulièrement vrai dans le cas des traitements par l'EDTA. En effet, les granules de R1 traités par ce chélateur de cations ne génèrent que des microparticules (phase MiTHy) et pas du tout de matériel soluble (phase SoTHy) à l'inverse des granules de R2 qui, eux génèrent une grande quantité de matériel soluble. Cependant, il est également possible que les conditions particulières de cultures auxquelles sont soumis ces agrégats génèrent des matrices d'EPS moins résistantes. Il serait alors intéressant de comparer les compositions respectives des matrices d'EPS de ces granules afin de voir si les différences de cohésion y sont liées. Etant donné que seuls les granules de R1 ont été observés en microscopie confocale, il serait également très intéressant de voir si l'organisation des deux structures cohésives, matrices protéiques englobant les cellules, et gangues polysidiques recouvrant le tout, s'applique de la même façon aux granules de R2.

Enfin, l'utilisation du test de contraintes hydrodynamiques pour évaluer la résistance des granules ne prend en compte qu'un seul aspect de la résistance mécanique des agrégats, à savoir, la résistance au détachement de surface. Afin de mieux connaître le rôle mécanique de chaque molécule composant la matrice d'EPS, il pourrait être très intéressant d'envisager d'autres types de mesures et de les combiner aux traitements enzymatiques et chimiques. En particulier, il serait possible de tirer des informations grâce à des tests de résistance à la compression, ainsi que grâce à des mesures de paramètres rhéologiques comme celles effectuées par Seviour et al. (2009a).

Conclusions générales

Par rapport au procédé classique de traitement des eaux usées par utilisation de boues activées flocculantes, le recours à un procédé granulaire offre de nombreux avantages. Ces avantages sont liés aux propriétés physiques caractéristiques des granules : leur compacité et leur densité élevée, et également leur cohésion importante. Au cours de cette étude, nous avons voulu améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires mettant en jeu les EPS présents dans la matrice et à l'origine des propriétés physiques des agrégats denses de type granules. Pour cela, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs.

La première tâche que nous nous sommes assignée, a été la mise au point d'un protocole d'extraction des EPS permettant la récupération d'une quantité significative de polymères représentatifs de la diversité biochimique de la matrice des granules. Le protocole multi-méthodes que nous avons choisi pour cela a permis de combiner les actions de trois méthodes distinctes d'extraction des EPS en les appliquant successivement au granule. La première étape utilise les ultrasons afin de déstabiliser de manière aspécifique les liaisons au sein de la matrice d'EPS. La seconde, consistant en une incubation d'une heure dans un détergent, le Tween (0,25 %) favorise l'extraction des composés hydrophobes, et, enfin, la dernière étape, une incubation d'une heure en présence d'un chélateur de cations, l'EDTA (2%), permet de séquestrer les cations divalents comme le calcium présents dans les agrégats, et ainsi altérer le pontage ionique pouvant lier les polymères anioniques entre eux.

La complémentarité des méthodes utilisées a permis une extraction poussée des EPS sans qu'aucune activité de la G6P-DH, une enzyme intracellulaire témoin de la lyse bactérienne, ne soit détectée. Ainsi, il a été possible d'extraire 292 mg d'EPS /g de MVS en réalisant quatre séquences successives de ce protocole. Les analyses du contenu des extraits obtenus ont montré que les EPS extraites des granules étaient constituées de 79,6 % de protéines pour 20,4% de polysaccharides (rapport PS/PN de 3,9). D'après ces résultats, les protéines sont donc les composés majeurs des granules. Ceci n'est pas surprenant, si on considère les travaux déjà effectués sur le sujet, car les résultats d'extraction d'EPS de granules issus de la littérature montrent principalement des matrices d'EPS majoritairement protéiques. En revanche, les polymères d'acides uroniques, également dosés lors de ces expériences, semblent peu représentés dans nos agrégats. Leur présence n'a été rapportée jusqu'à présent que dans des boues granulaires anaérobies et à de très faibles teneurs (D'Abzac et al., 2010a)

En s'attardant sur l'évolution des quantités de chacun des différents types d'EPS extraits à chaque séquence successive du protocole multi-méthodes, nous avons également pu comparer leurs cinétiques d'extraction pouvant refléter leurs degrés d'attachement à la matrice granulaire. Ainsi, selon nos observations, les polysaccharides sont plus rapidement extractibles de la matrice des agrégats par rapport aux protéines. En outre, il semblerait que les acides uroniques, pourtant peu représentés montrent un attachement particulièrement élevé à la matrice d'EPS. Compte-tenu du fort pouvoir cohésif et gélifiant de ces molécules, il serait intéressant d'étudier plus en détail leur rôle dans la cohésion des granules.

Dans un second temps, l'analyse des produits d'extraction que nous avons à disposition a permis mettre en évidence certaines caractéristiques chimiques des EPS des granules. La répartition quantitative des EPS extraits lors des différentes méthodes d'extraction a permis d'établir le profil ou « empreinte du protocole multi-méthode ». Ainsi, les EPS de granules se distinguent de ceux extraits de floccs par le même protocole par un plus fort rendement d'extraction par l'EDTA et un plus faible par le détergent. Outre sa capacité d'extraction relativement efficace, le protocole choisi permet d'établir rapidement un profil et surtout de réaliser un premier fractionnement en fonction des propriétés chimiques et/ou cohésives des EPS.

La capacité de fractionnement du protocole a été validée lors des analyses de chacun des extraits par chromatographies de filtration sur gel et d'échanges d'ions. Suite aux expériences de filtration sur gel, nous avons vu que les EPS des granules étaient caractérisées par une diversité de taille importante pouvant aller jusqu'à 450 kDa et descendre en dessous de 1 kDa. Cette diversité paraît plus importante pour les EPS extraits lors des étapes Tween mais il faudrait maintenant utiliser des colonnes de filtration plus résolutive afin d'identifier des protéines masquées par d'autres molécules de tailles voisines mais plus représentées. La colonne choisie a l'avantage de permettre de visualiser les molécules extraites sur une large gamme de tailles, ce qui a permis de mettre en évidence des formes colloïdales résultant de l'association de plusieurs polymères entre eux. Une perspective intéressante serait d'identifier maintenant la nature et les propriétés chimiques des polymères et/ou composés minéraux composant ces colloïdes qui restent associés *in vitro* et ceci malgré la présence du détergent ou du chélateur de cations. Ces associations maintenues *in vitro* pourraient en effet refléter des associations existant *in situ* établies grâce au pouvoir cohésif de certains EPS.

L'analyse des charges anioniques a été réalisée par chromatographie d'échange d'anions à pH 8, pH proche de celui de fonctionnement des réacteurs. Les profils d'élution des EPS extraites lors des étapes de sonication et d'incubation avec l'EDTA indiquent la présence d'un groupe de protéines fortement anioniques car éluées à de fortes concentrations en sel. Ces protéines sont très peu représentées dans les extraits obtenus à partir de boues floculantes, ce qui suggère que la densification des granules pourrait s'accompagner ou résulter d'une augmentation globale des EPS chargées négativement suite à leur immobilisation au cœur de la matrice par pontage via des cations divalents. Même si la détection par spectrophotométrie à 280 nm de ces molécules est en faveur de fractions protéiques, une analyse plus poussée par infra rouge pourrait être effectuée pour préciser la nature des fonctions chimiques présentes.

Dans un troisième temps, à l'aide d'incubation dans des solutions contenant diverses enzymes, nous avons cherché à cibler plus spécifiquement les protéines ou polysaccharides afin de déterminer quelles étaient les EPS sources de cohésion dans les granules. Ces expériences ont été combinées aux observations *in situ* de coupes de granules sur lesquelles les EPS ont été marquées de manière à replacer dans l'espace les éléments structurants des agrégats.

Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence deux structures cohésives distinctes probablement à l'origine des propriétés physiques des agrégats étudiés. D'après nos résultats, la première structure, sensible à la digestion par des α -amylases, consiste en une fine gangue majoritairement composée d' α (1-4) glucanes englobant des microcolonies et groupes de microcolonies. Cette gangue est aussi retrouvée à la périphérie des agrégats. Au sein de cette structure, la cohésion provient vraisemblablement de l'établissement de liaisons hydrogène ou de liaison de Van der Waals entre les différents polymères.

La seconde structure consiste en une matrice majoritairement protéique présente dans l'ensemble du granule à l'exception du cœur minéral (issu de la précipitation de phosphates). Cette structure protéique est digérée par l'action de protéases à large spécificité comme la savinase et se désintègre presque totalement lorsqu'elle est incubée dans des solutions d'EDTA. Nous avons pu déduire de ce dernier point que la cohésion dans cette structure était basée sur l'établissement de liaisons ioniques et en particulier sur l'existence d'un pontage par les ions calcium entre les protéines. Il conviendrait cependant de clarifier si ce mécanisme implique bien les protéines extracellulaires de la matrice et pas les protéines membranaires ou le peptido-glycane de la paroi. Ces résultats confortent les résultats de « l'empreinte du protocole multi-méthode » et la forte extractibilité des EPS de granules par l'EDTA. De plus, ils indiquent que ce sont majoritairement les protéines qui sont reliées par des ponts calcium.

Ces deux structures, indépendantes l'une de l'autre sont toutes les deux indispensables à l'intégrité physique des granules car leur destruction entraîne un fort abaissement de la résistance des agrégats aux contraintes hydrodynamiques.

Dans l'état actuel de nos connaissances sur les granules, il est difficile de relier précisément la répartition des constituants de ces deux structures à celle des microorganismes colonisant les agrégats. En particulier, les populations de NOB et AOB marquées par la technique FISH sont trop peu représentées pour établir une corrélation fiable avec les EPS. L'étude réalisée sur les granules de R1 lors de la thèse de Ahlem Filali (2011) montre néanmoins une répartition des AOB sous forme de microcolonies dans tout le granule et de façon ponctuelle près des canaux, et des NOB en profondeur.

A partir de là, un certain nombre de questions restent posées. La gangue de polysaccharides de la première structure est-elle sécrétée préférentiellement par des autotrophes ou des hétérotrophes ? Il serait intéressant dans ce cadre d'analyser les activités microbiennes des fractions détachées ou restantes. Une diversification des sondes FISH utilisées apporterait également de nouvelles informations pour mieux comprendre comment la sélection de certains microorganismes, en favorisant la production de types particuliers d'EPS, influe sur les propriétés physiques des agrégats. Une caractérisation microbiologique orientée sur les espèces hétérotrophes apporterait certainement plus d'information.

Grace à ces observations, il est possible d'établir un modèle de structure globale du granule qui rend compte du rôle respectif de ces deux structures cohésives (figure 101). Ce modèle permet de comprendre le relargage de matière organique plutôt sous la forme de macroparticules lorsque la structure polysidique est dégradée par digestion par une α -amylase, et plutôt sous la forme de microparticules lorsque c'est la structure protéique qui est attaquée par digestion par une protéase ou, lors d'une incubation dans de l'EDTA.

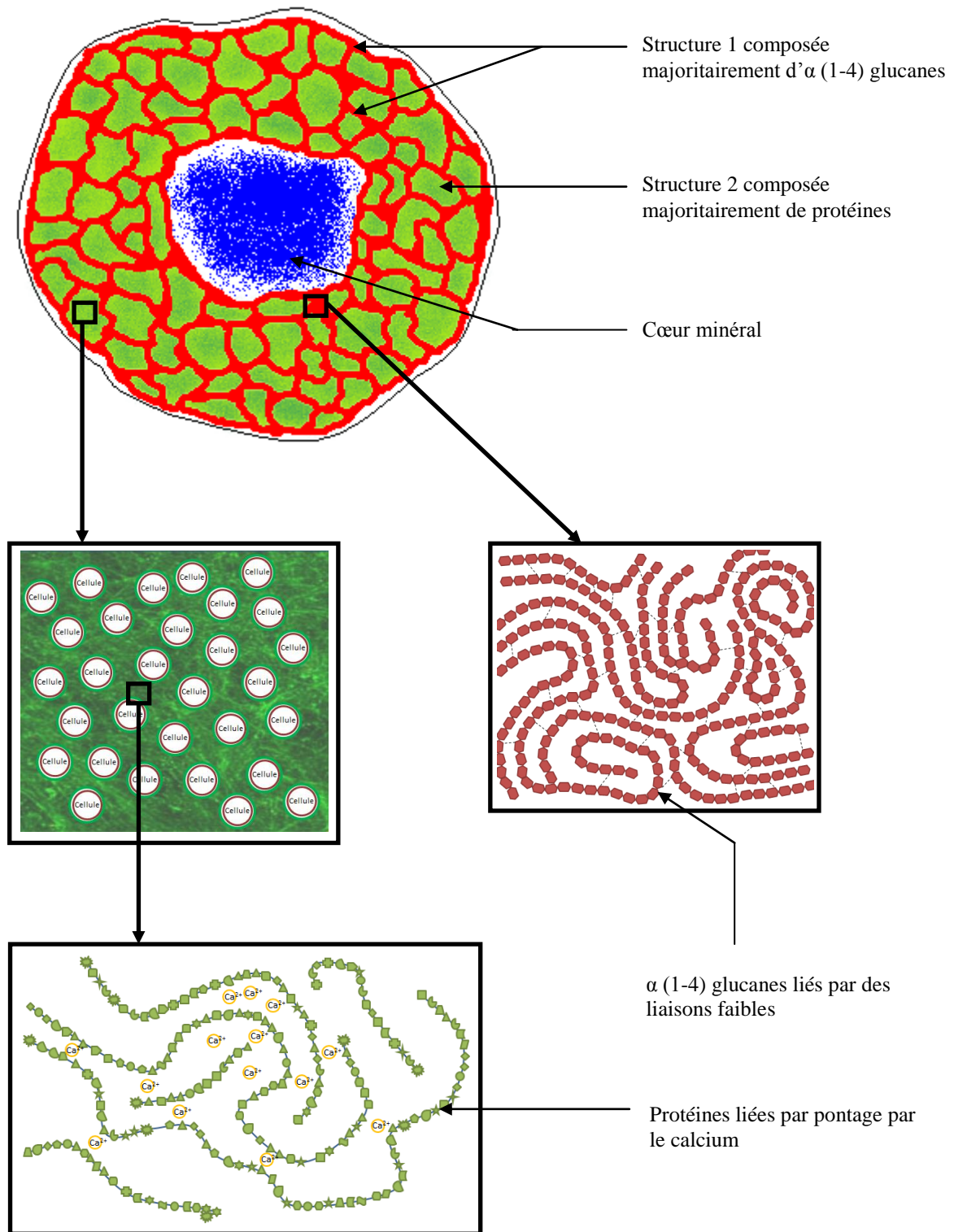


Figure 101 : Modèle de structure de granule aérobie étudié.

Ce modèle permet de proposer une explication au fait que, tout en étant indépendantes, les deux structures cohésives sont toutes les deux indispensables à l'intégrité physique des granules. La collecte et l'analyse, après concentration, des molécules détachées pourraient apporter d'avantage d'informations sur ces structures. Ces analyses peuvent être réalisées par dosage des protéines, sucres et acides uroniques, ou encore par chromatographie.

Au travers de cette étude, nous avons donc abouti à une vision plus précise des mécanismes de cohésion dans les granules étudiés en montrant que l'établissement de ponts ioniques entre protéines et la présence d'une gangue compacte de polysaccharides étaient des facteurs assurant la cohésion. Ce travail a abouti à la mise au point d'un certain nombre d'outils permettant l'extraction, le fractionnement des EPS et l'analyse de la cohésion des agrégats par un test hydrodynamique. Il a aussi permis de confronter une approche *in vitro* basée sur l'extraction des EPS à l'observation *in situ* par marquage des protéines et de certains motifs polysaccharidiques. Il pourrait être intéressant à partir de là de poursuivre ces expérimentations en utilisant d'autres marqueurs de type lectine avec des spécificités différentes.

La compréhension de la cohésion des granules peut également être améliorée par une caractérisation plus poussée de leurs propriétés physiques. En effet, en plus de mesurer la résistance aux contraintes de cisaillement, générées en cuve agitée, il serait également possible de mesurer l'impact d'autres types de contraintes, comme notamment les contraintes de compressions ou les chocs. Cela permettrait de connaître les rôles respectifs des différents EPS vis-à-vis de ces paramètres.

Enfin, il faudrait pouvoir relier ces conclusions à l'impact des conditions de culture des granules. En effet, par exemple, l'ajout de calcium dans le milieu pourrait accroître la cohésion de la structure protéique et faciliter la formation de nouveaux granules. De la même façon, il serait intéressant de pouvoir relier les conséquences de modifications du ratio C/N sur les propriétés physiques des granules aux caractéristiques des deux structures cohésives observées.

Liste des références bibliographiques

D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G. (2010a). Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 1589–1599.

D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G. (2010b). Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 80, 161–168.

Adav S.S. and Lee D.J., Tay J.H. (2008). Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research*, 42, 1644 – 1650.

Adav S.S. and Lee D.J. (2008). Extraction of extracellular polymeric substances from aerobic granule with compact interior structure. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 1120-1126.

Adav S.S., Lee D.J., Show K.Y., Tay J.H. (2008). Aerobic granular sludge: Recent advances. *Biotechnology Advances*, 26, 411–423.

AFNOR, 1994. Recueil de normes française. Qualité de l'eau.

Ahimou F., Semmens M.J., Haugstad G. and Novak P.J. (2007). Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (9), 2905- 2910.

Allison D. G., Ruiz B., SanJose C., jaspe A., Gilbert G. (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. 167, 179–184.

Amann, R.I., Krumholz, L. and Stahl, D.A. (1990). Fluorescent-Oligonucleotide Probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic, and Environmental-Studies in Microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172 (2), 762-770.

Apilánéz I., Gutiérrez A., Díaz M. (1995). Effect of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology*, 66, 225-230.

Avella A.C., Delgado L.F., Görner T., Albasi C., Galmiche M., de Donato Ph. (2010). Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor, *Bioresource Technology*, 101 (2), 518-526.

Beun J.J., Hendriks A., van Loosdrecht M.C.M., Morgenroth E., Wilderer P.A., Heijnen J.J (1998). Aerobic granulation in a sequencing batch reactor. *Water Research*, 33(10), 2283–2290.

Beun J.J., van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J.J. (2002). Aerobic granulation in a sequencing batch airlift reactor. *Water Research*, 36, 702–712.

Bielecki, S., Krystynowicz, A., Turkiewicz, M., Kalinowska, H. (2005). Bacterial Cellulose. *Biopolymers Online*. 5, 37-46.

Boëglin J.C (1998). Traitements biologiques des eaux residuaires. *Techniques Ingenieur* (J3942)

Bourven I., Costa G., Guibaud G. (2011). Qualitative characterization of the protein fraction of Exopolymeric Substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. *Bioresource Technology*. Article in press.

Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) resulting from activated sludge according to their type: Soluble or bound. *Process Biochemistry* 41, 815–823.

Cotton L.A., Graham R.J., Lee R.J. (2009). The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEM)*. 13, 58-62.

Pechaud Y., Marcato-Romain C.E., Girbal-Neuhauser E., Queinnec I., Bessiere Y., Paul E. (2012). Combining hydrodynamic and enzymatic treatments for the intensification of multi-species thick biofilm removal. (Article in press).

Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H. and Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*. 22 (3), 434-444.

De Bruin L.M.M., de Kreuk M.K., van der Roest H.F.R., Uijterlinde C., van Loosdrecht M.C.M. (2004). Aerobic granular sludge technology: an alternative to activated sludge? *Water Science and Technology*, 49 (11–12) 1–7

De Kreuk M.K., Kishida N., van Loosdrecht M.C.M., (2007). Aerobic granular sludge – state of the art. *Water Science & Technology*, 55 (8–9), 75–81.

De Kreuk, M.K. and van Loosdrecht, M.C.M. (2004). Selection of slow growing organisms as a means for improving aerobic granular sludge stability. *Water Science & Technology*, 49(11–12), 9–19.

Dreywood R. (1946). Qualitative test for carbohydrate material. *Industrial Engineering Chemistry*, 18, 499.

- Durmaz B. and Sanin F.D.** (2001). Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. *Water Science and Technology*, 44 (10), 221-229.
- Elenter D., Milferstedt K., Zhang W., Hausner M. and Morgenroth E.** (2007). Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water Research*, 41, 4657-4671.
- Ferry J.D.**, (1980). Viscoelastic Properties of Polymer Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 41, 43-51.
- Filali A.** (2011). Analyse et modélisation du traitement de l'azote dans un procédé de granulation aérobie hybride. Thèse INSA, Toulouse.
- Gacesa P.** (1998). Bacterial alginate biosynthesis--recent progress and future prospects. *Microbiology*. 144 (5), 1133-1143.
- Gao B., Zhu X., Xu C., Yue Q., Li W. and Wey, J.** (2008). Influence of extracellular polymeric substances on microbial activity and cell hydrophobicity in biofilms. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83, 227-232.
- Gaudy A.F.Jr. and Gaudy E.T** (1980). Microbiology for environmental scientists and engineers. *Water Ressources and Environmental Engeneering*, Mc Graw-Hill.
- Greenspan P., and Fowler S.D.** (2010). Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. *Journal of Lipid Research*, 26, 781-789.
- Hermansson M.** (1999). The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 14, 105-119.
- Houari A., Picard J., Habarou H., Galas L.** (2008). Rheology of biofilms formed at the surface of NF membranes in a drinking water production unit. *Biofouling*, 24 (4), 235-240.
- Jahn A. and Nielsen P.H.** (1998). Cell biomass and expolymer composition in sewer biofilms. *Water Science and Technology*, 37 (1), 17-24.
- Kadokawa J.I., Murakami M.A., Kaneko Y.** (2008). A facile preparation of gel materials from a solution of cellulose in ionic liquid. *Carbohydrate Research*, 343, 769-772.
- Kämpfer P., Weltin D., Hoffmeister D., Dott W.** (1995). Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water Research*, 29, 1585-1588.

Kim H. and Pagilla K.R. (2000). Competitive growth of *Norcadia* and *Acinetobacter* under anaerobic/aerobic batch operation. *Water Research*, 34, 2667-2674.

Lahaye E., Aubry T., Fleury V., Sire O. (2007). Does Water Activity Rule *P. mirabilis* Periodic Swarming? II. Viscoelasticity and Water Balance during Swarming. *Biomacromolecules*. 8, 1228-1235.

Laurent J. (2009). Modification de la répartition d'espèces métalliques (Cd, Cu) induites par des traitements physique (ultrasons), chimique (ozone) et thermique au sein des procédés à boues activées. Thèse ENSIL, Limoge.

Lawrence J.R., Swerhone G.D., Kuhlicke U., Neu T.R. (2007). In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian Journal of Microbiology*. 53 (3), 450-458.

Lee K.Y. and Mooney D.J. (2001). Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical reviews*, 101, 7, 1869-1877.

Lemaire R., Webb R.I., Yuan Z. (2008a). Micro-scale observations of the structure of aerobic microbial granules used for the treatment of nutrient-rich industrial wastewater. *The ISME Journal*, 2, 528–541.

Lemaire R., Yuan Z., Blackall L.L., Crocetti G.R. (2008b). Microbial distribution of *Accumulibacter* spp. And *Competibacter* spp. in aerobic granules from a lab-scale biological nutrient removal system. *Environmental Microbiology*, 10 (2), 354–363.

Lessie T.G. and Vander Wyk J.C. (1972). Multiple forms of *Pseudomonas multivorans* glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases: differences in size, pyridine nucleotide specificity and susceptibility to inhibition by adenosine 5'-triphosphate. *Journal of Bacteriology*, 110 (3), 1107-1117.

Li A.J., Yang S.F., Li X.Y., Gu J.D. (2008). Microbial population dynamics during aerobic sludge granulation at different organic loading rates. *Water research*, 42, 3552 – 3560.

Li Z.H., Kuba T., Kusuda T. (2006). The influence of starvation phase on the properties and the development of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 670–674

Liu Y. and Tay J.H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36 (7), 1653-1665.

Liu Y., Xu H., Yang SF., Tay J.H. (2003). A general model for biosorption of Cd²⁺ Cu²⁺ and Zn²⁺ by aerobic granules. *Journal of Biotechnology*, 102, 233–239.

- Liu, Y., Yang, S.-F. and Tay, J.-H.** (2004a). Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. *Journal of Biotechnology*, 108(2), 161–169.
- Liu, Y.Q., Liu, Y. and Tay, J.H.** (2004b). The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(2), 143–148.
- Madoni P., Davoli D., Gibin G.** (2000). Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated sludge plants in Italy. *Water Research*, 34 (6), 1767-1772.
- Mañas A.** (2011). Immobilisation du phosphore par précipitation induite dans un procédé aérobie à biomasse granulaire. Thèse INSA, Toulouse.
- Mañas A., Biscans B., F. Decker, Spérandio M.** (2012). Location and chemical composition of microbially induced phosphorus precipitates in anaerobic and aerobic granular sludge. (article in press).
- Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J., Flemming H.C.** (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 3–16.
- McSwain B.S., Irvine R.L., Hausner M. and Widerer P.A.** (2005). Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (2), 1051-1057.
- Metcalf and Eddy** (1991). Wastewater engineering: treatment disposal and reuse. McGRAW-HILL, New York.
- Mikkelsen L.H. and Nielsen P.H.** (2001). Quantification of the bond energy of bacteria attached to activated sludge floc surfaces. *Water Science & Technology*, 43 (6), 67–75.
- Mohammed Z.H., Haque A., Richardson R.K., Morris E.R.,** (2007). Promotion and inhibition of xanthan 'weak-gel' rheology by calcium ions. *Carbohydrate Polymers*, 70, 38-45.
- Münch E.V., Lant P., Keller J.** (1996). Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors. *Water Resource*, 30 (2), 277-284.
- Nickerson M.T., Paulson A.T., Speers R.A.** (2003). Rheological properties of gellan solutions: effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation. *Food Hydrocolloids*, 17, 577–583.

Nor-Anuar A., Ujang Z., van Loosdrecht, M.C.M, de Kreuk, M.K. and Olsson, G. (2009). Study on the Strength Characteristic of Aerobic Granular Sludge. *Proceedings of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE Conference and Exhibition, October 2009, Taiwan.*

Pamp S.J., Gjermansen M., Tolker-Nielsen T. (2007). The Biofilm Matrix: A Sticky Framework. *The Biofilm Mode of Life: Mechanisms and Adaptations.* Chapitre 4, 36-69.

Pevere A., Guibaud G., van Hullebusch E.D., Boughzala W., Lens P.N.L. (2007). Effect of Na⁺ and Ca²⁺ on the aggregation properties of sieved anaerobic granular sludge. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 306, 142–149.

Phillips L.G., Whitehead D.M., Kinsella J. (1994). Structure-Function Properties of Food Proteins. *Academic Press.*

Qin L., Liu Y. Tay J.H. (2004). Effect of settling time on aerobic granulation in sequencing batch reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 21, 47–52.

Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Lefebvre D (2008a). A high yield multi-method extraction protocol for protein quantification in activated sludge. *Bioresource Technology*, 99, 7464–7471.

Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Lefebvre D, Sperandio M. (2008b). Protein extraction from activated sludge : An analytical approach. *Water Research.* 42, 1867–1878.

Ras M. (2008). Mise au point et validation d'une procédure d'extraction de Substances Polymériques Extracellulaires : Application à la caractérisation d'agrégats microbiens issus des procédés de traitement des eaux. Thèse INSA, Toulouse.

Ras M., Lefebvre D, Derlon N., Paul E., Girbal-Neuhauser E. (2011). Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Research.* 45 (4), 1529-1538.

Renard D., van de Velde F., Visschers R.W., (2006). The gap between food gel structure, texture and perception. *Food Hydrocolloids* 20, 423-431.

Seviour T., Pijuan M., Nicholson T., Keller J., Yuan Z. (2009a). Understanding the Properties of Aerobic Sludge Granules as Hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering*, 102, (5), 1483-1493.

Seviour T., Pijuan M., Nicholson T., Keller J., Yuan Z. (2009b). Gel-forming exopolysaccharides explain basic differences between structures of aerobic sludge granules and floccular sludges. *water research*, 43, 4469-4478.

Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y. (2006). Stability of sludge flocs under shear conditions: roles of extracellular polymeric substances (EPS). *Biotechnology and Bioengineering*, 93, 1095-1102.

Shimada K., and Matsushita S., (1980). Relationship between Thermocoagulation of Proteins and Amino Acid Compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 413-417.

Simon S., Païro B., Villain M., D'Abzac P., Van Hullebusch E., Lens P., Guibaud G., (2009). Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresource Technology*, 100, 6258-6268

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H. Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. and Klenk D.C. (1985). Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 76-85.

Sobeck D.C. and Higgins M.J. (2002). Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Research*, 36, 527-538.

Stapper P.S., Narasimhan G., Ohman D.E., Barakat J., Hentzer M., Molin S., Kharazmi A., Høiby N., Mathee K. (2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 679–690.

Sutherland I.W. (2001). Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology*. 43, (6), 77–86.

Tay J.H., Liu Q.-S., Liu Y. (2001a). The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 227–233.

Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y. (2001b). The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 222-226.

Tsai M.W., Lee D.J., Lai J.Y. (2008). Mass transfer limit of fluorescent dyes during multicolour staining of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 907–913.

Turgeon S.L., and Beaulieu M., (2001) Improvement and modification of whey protein texture using polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 15, 583-591.

Urbain V., Block J.C. and Manem J. (1993). Bioflocculation in activated sludge: an analytical approach. *Water Research*, 27 (5), 829-838.

- van den Hoogen B.M., van Golde L.M.G., van Weeren P.R., Lopes-Cardozo M., Barneveld A., van de Lest C.H.A.** (1998). A Microtiter Plate Assay for the Determination of Uronic Acids *Analytical Biochemistry*, 257, 107–111.
- Visvanathan C., Aim R.B., Parameshwaran K.** (2000). Membrane separation bioreactor for wastewater treatment. *Critical Review of Environmental Science Technoogy*, 30, 1-48.
- Wan J. and Spérandio M.** (2009). Possible role of denitrification on aerobic granular sludge formation in sequencing batch reactor. *Chemosphere*. 75 (2), 220-227.
- Wan J.** (2009). Interaction entre l'élimination des polluants azotes et la formation des granules aérobies en réacteur biologique séquencé. Thèse INSA, Toulouse.
- Wan J., Bessière Y., Spérandio M.** (2009) Alternating anoxic feast / aerobic famine condition for improving granular sludge formation in sequencing batch airlift reactor at reduced aeration rate. *water research*, 43, 5097–5108.
- Wan J., Mozo I., Bessière Y., Liné A., Spérandio M.** (2011) Evolution of bioaggregate strength during aerobic granular sludge formation. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59, 69-78.
- Wang Z.W., Liu Y., Tay J.H.** (2005) Distribution of EPS and cell surface hydrophobicity in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 469–473.
- Wang Z., Liu L., Yao J., Cai W.** (2006). Effects of extracellular polymeric substances on aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Chemosphere*, 63, 1728–1735.
- Wanner J.** (1994). Activated sludge bulking and foaming control. *Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster-Basle*, 87-129.
- Weber S. D., Ludwig W., Schleifer K.-H., Fried J.** (2007). Microbial Composition and Structure of Aerobic Granular Sewage Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (19), 6233–6240.
- Wilén B.M. and Balmér P.** (1999). The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*, 33 (2), 391-400.
- Wilén B.M., Nielsen J.L., Keiding K., Nielsen P.H.** (2000). Influence of microbial activity on the stability of activated sludge flocs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18 (2), 145-156.
- Wilén B.M., Jin B. and Lant P.** (2003). The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research*, 37 (9), 2127-2139.

Yang S.F., Tay J.H., Liu Y. (2005). Effect of Substrate Nitrogen/Chemical Oxygen Demand Ratio on the Formation of Aerobic Granules. *Journal of Environmental Engineering*. 131 (1), 86-92.

Yilmaz G., Lemaire R., Keller J., Yuan Z., (2007). Simultaneous Nitrification, Denitrification, and Phosphorus Removal From Nutrient-Rich Industrial Wastewater Using Granular Sludge. *Biotechnology and Bioengineering*, 100 (3), 529–541.

Zhang L., Feng X., Zhuc N., Chen J., (2007). Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 551–557.

Zheng Y.M., Yu H.Q., Sheng G.P. (2005). Physical and chemical characteristics of granular activated sludge from a sequencing batch airlift reactor. *Process Biochemistry*, 40, 645–650.

Zita A. and Hermansson M. (1994). Effect of ionic strength on bacterial adhesion and stability of flocs in a wastewater activated sludge system. *Applied. Environmental. Microbiology*. 60 (9), 3041–3048.

Annexes

Annexe 1 : Images confocales de granules en coupe

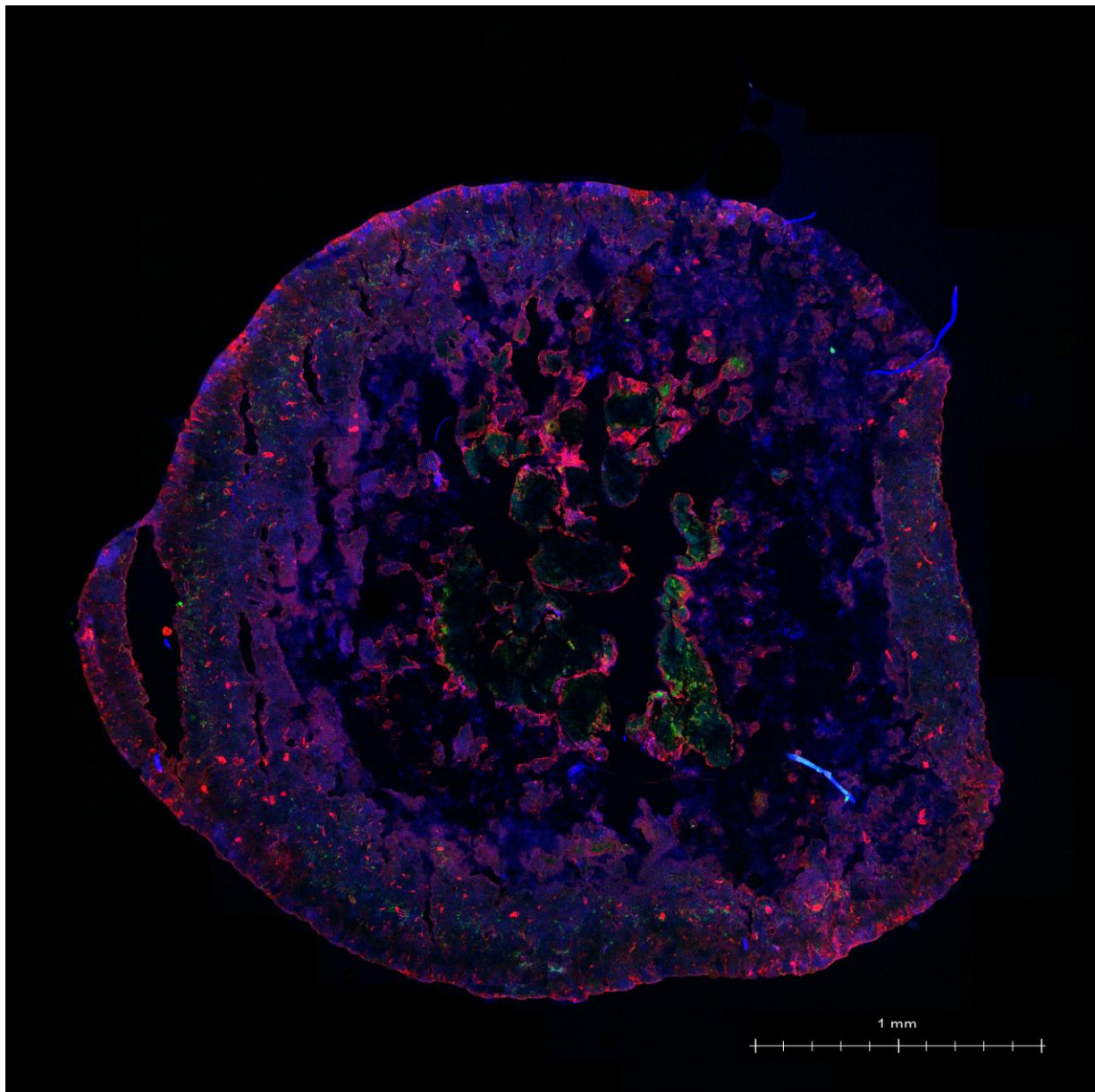


Figure 102 : Répartition globale des polysaccharides à résidus glucose ou mannose dans un granule de RI. Le granule est coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection des bactéries AOB (en vert), ou par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les polysaccharides possédant des résidus glucose et mannose sont marqués par la concanaviline A (en rouge).

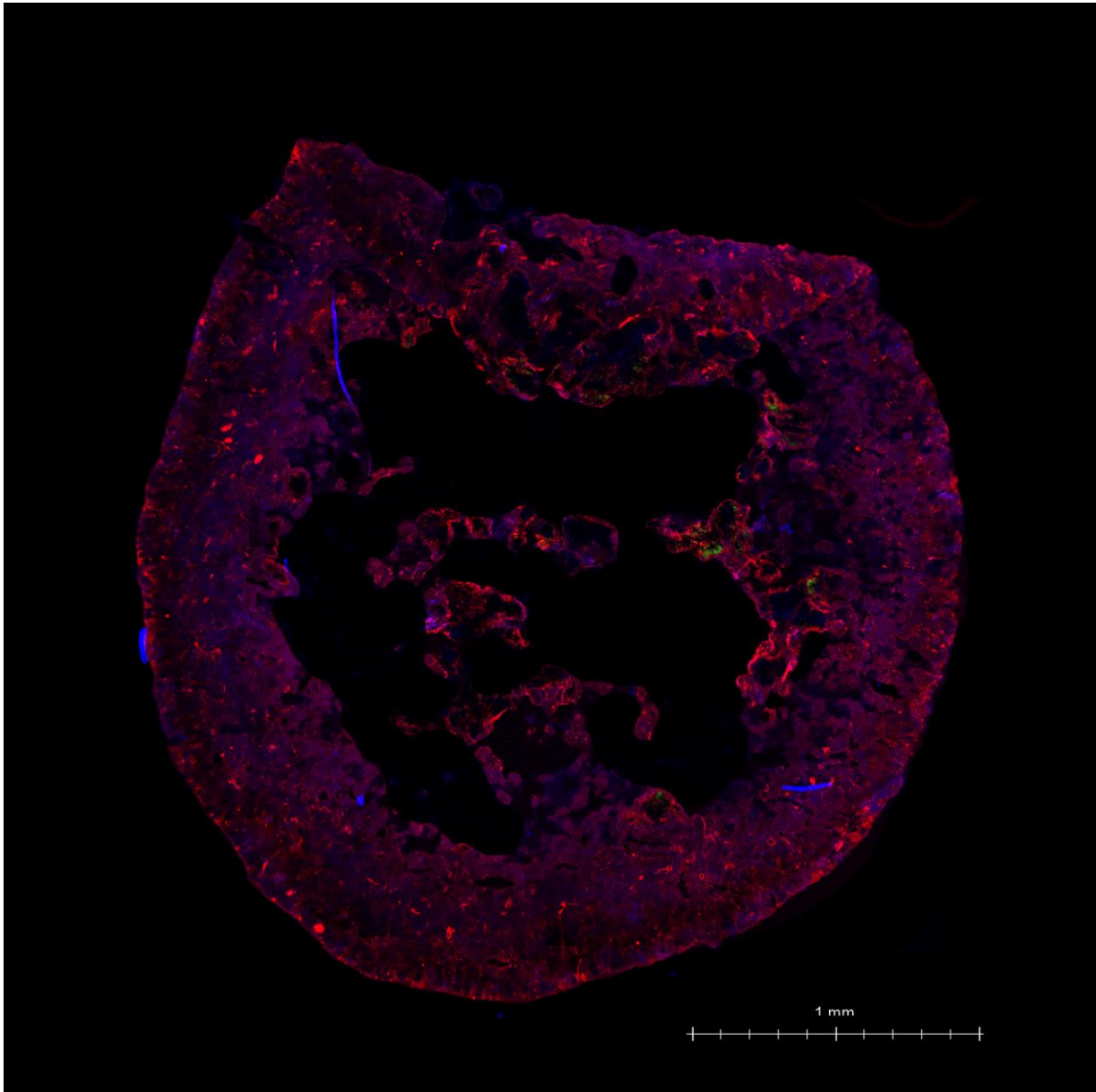


Figure 103 : Répartition globale des polysaccharides à résidus glucose ou mannose dans un granules de RI. Le granule est coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection des bactéries NOB (en vert), ou par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les polysaccharides possédant des résidus glucose et mannose sont marqués par la concanavaline A (en rouge).

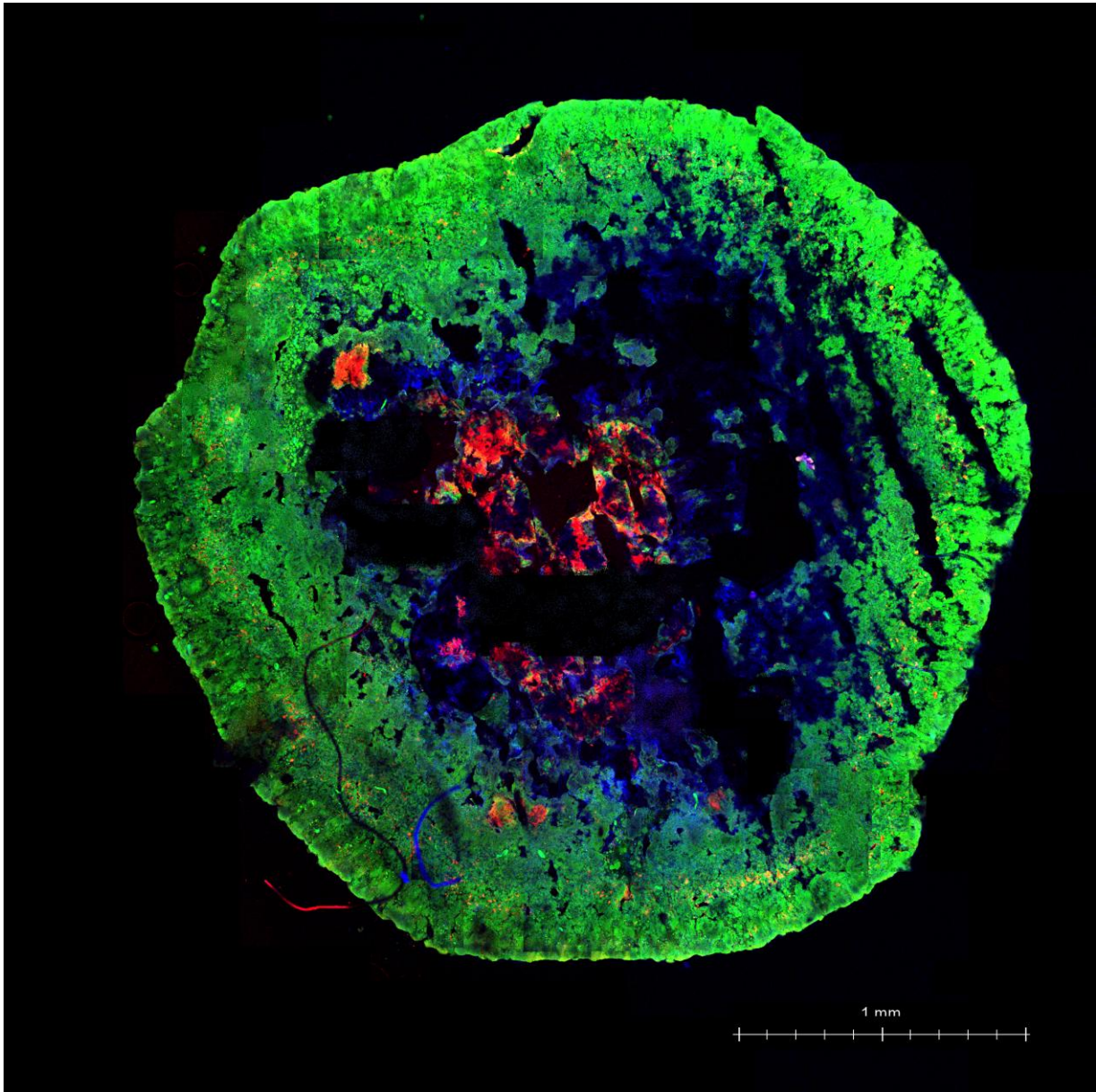


Figure 104 : Répartition globale des protéines dans un granule de RI. Le granule est coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection des bactéries AOB (en rouge), ou par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les protéines sont marquées par le FITC (en vert).

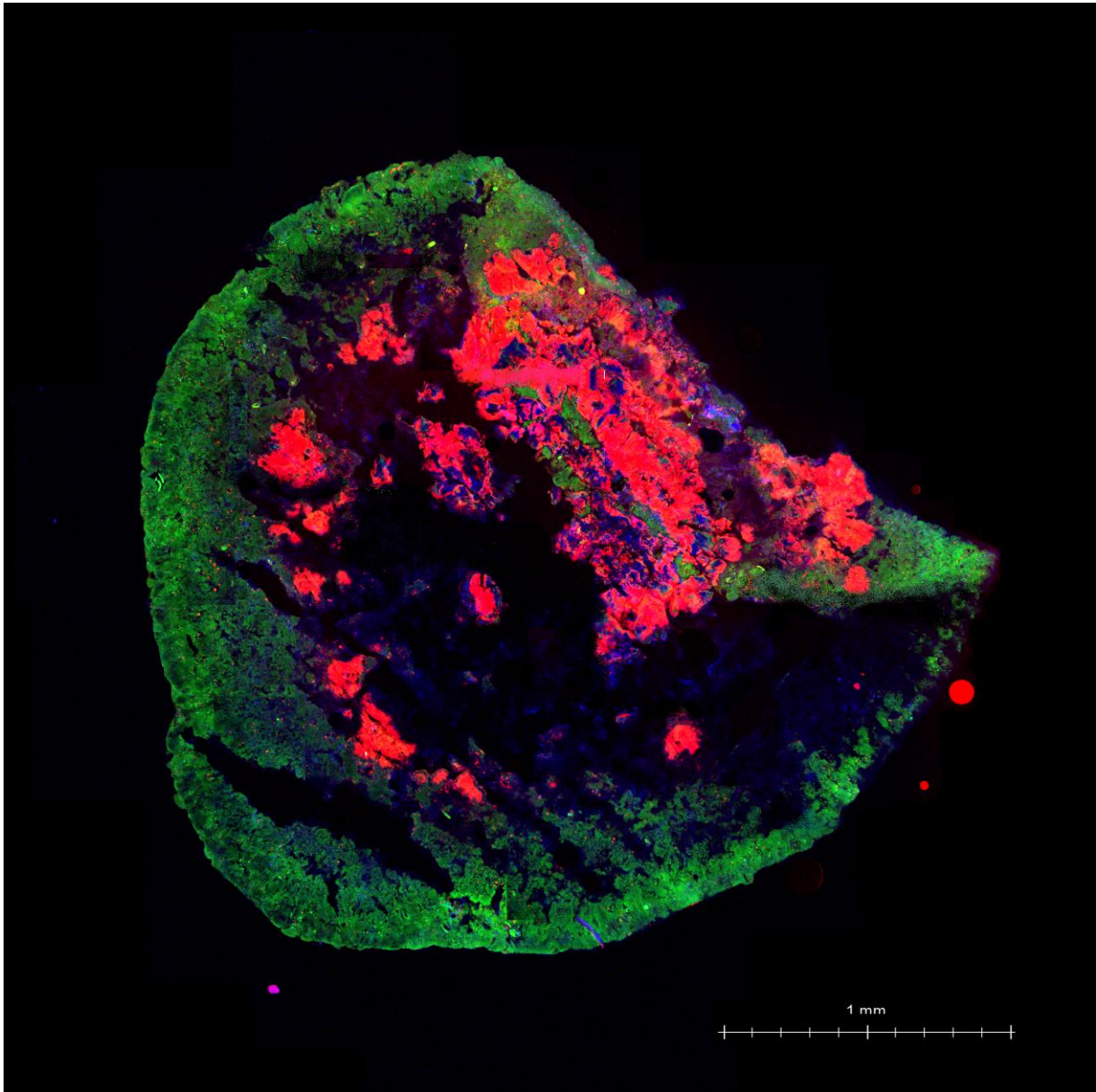


Figure 105 : Répartition globale des protéines dans un granule de RI. Le granule est coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection des bactéries NOB (en rouge), ou par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les protéines sont marquées par le FITC (en vert).

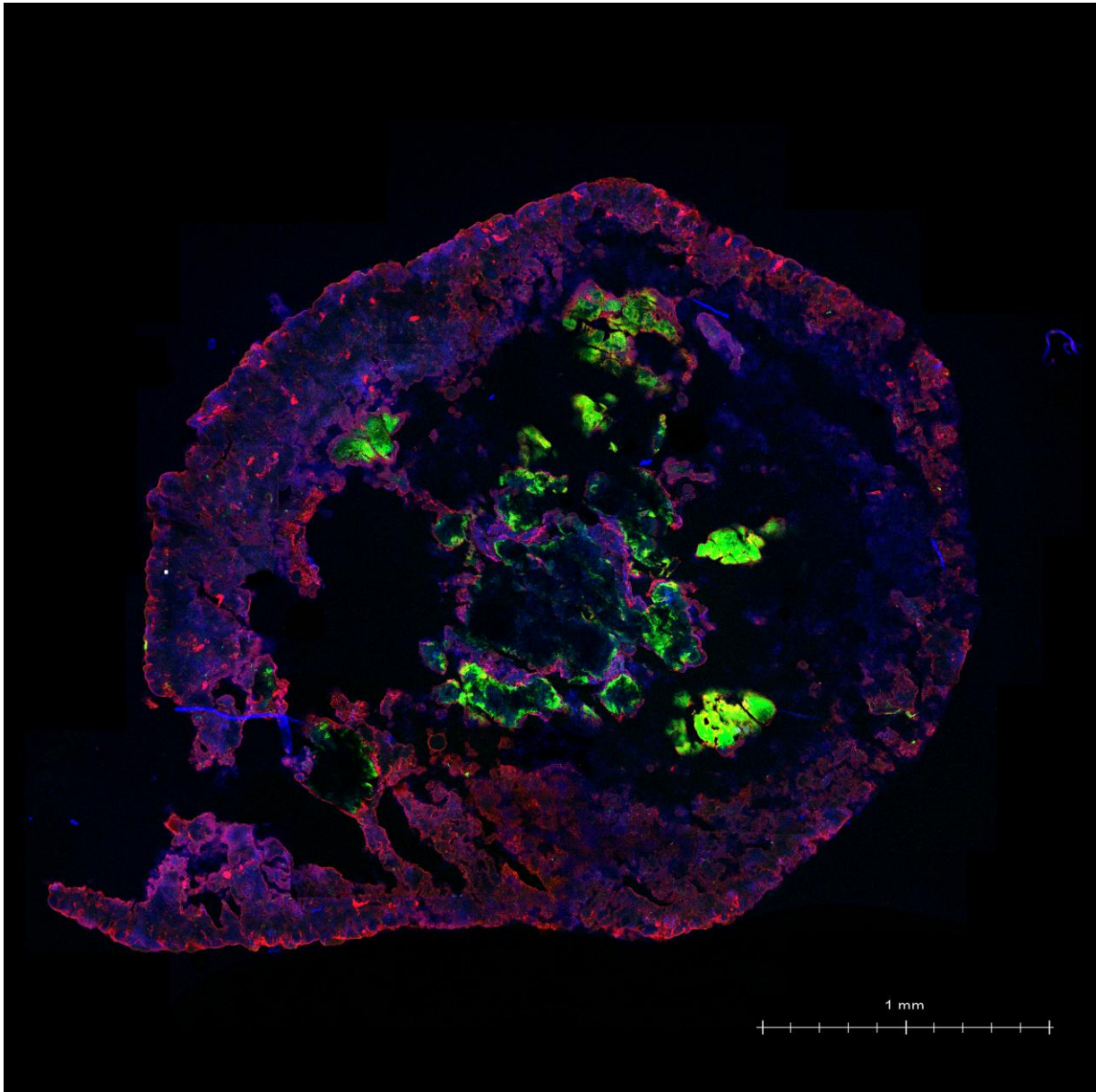


Figure 106 : Répartition des polysaccharides et micro-organismes dans un granule de RI soumis à une contrainte hydrodynamique. Après incubation de 24 h à 35 °C dans le PBS 1X pH 7,5, le granule est incubé en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection de bactéries AOB (en vert) et par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les polysaccharides possédant des résidus glucose et mannose sont marqués par la concanavaleine A (en rouge).

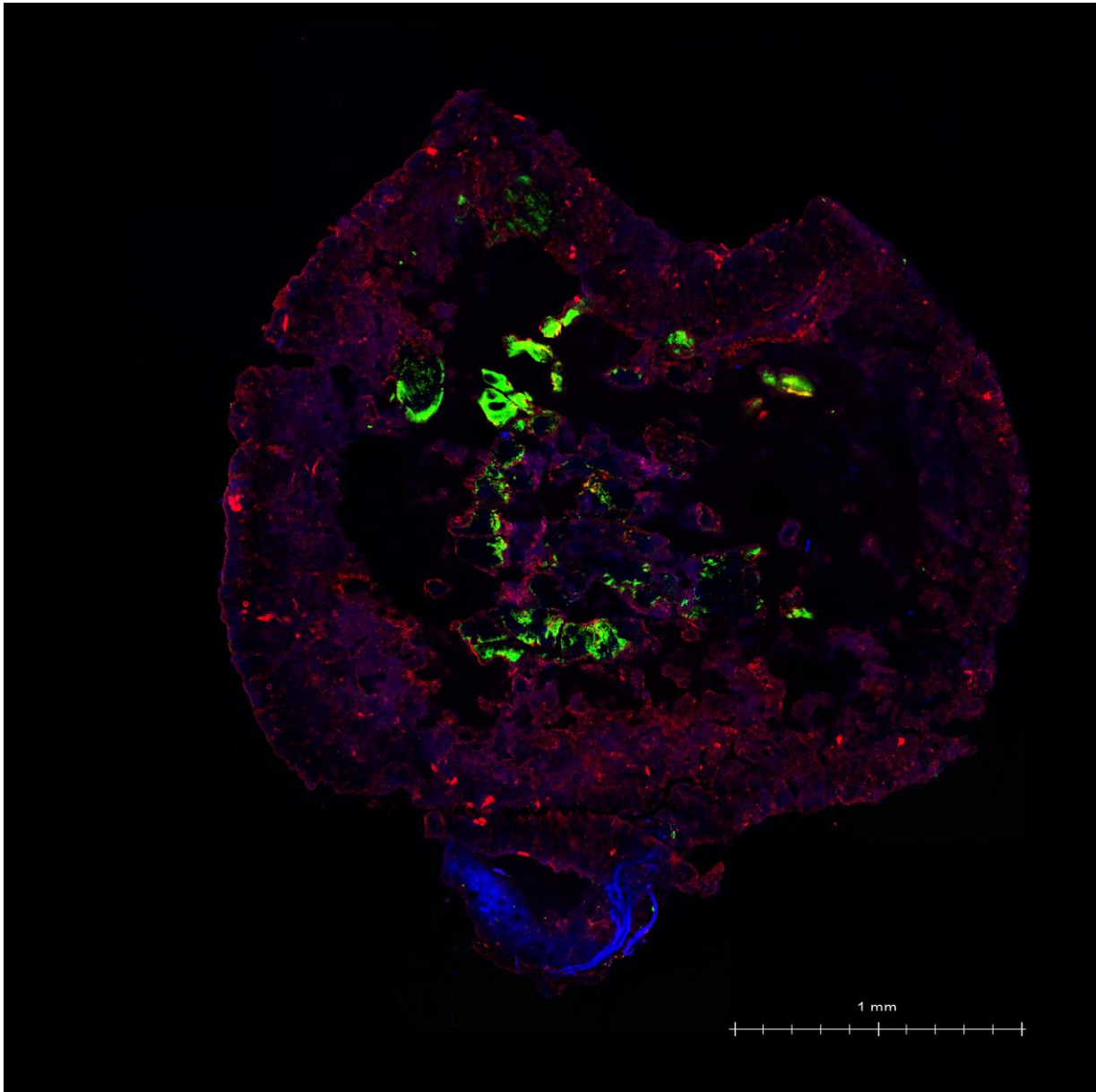


Figure 107 : Répartition des polysaccharides et micro-organismes dans un granule de RI soumis à une contrainte hydrodynamique. Après incubation de 24 h à 35 °C dans le PBS 1X pH 7,5, le granule est incubé en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection de bactéries NOB (en vert) et par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les polysaccharides possédant des résidus glucose et mannose sont marqués par la concanavaleine A (en rouge).

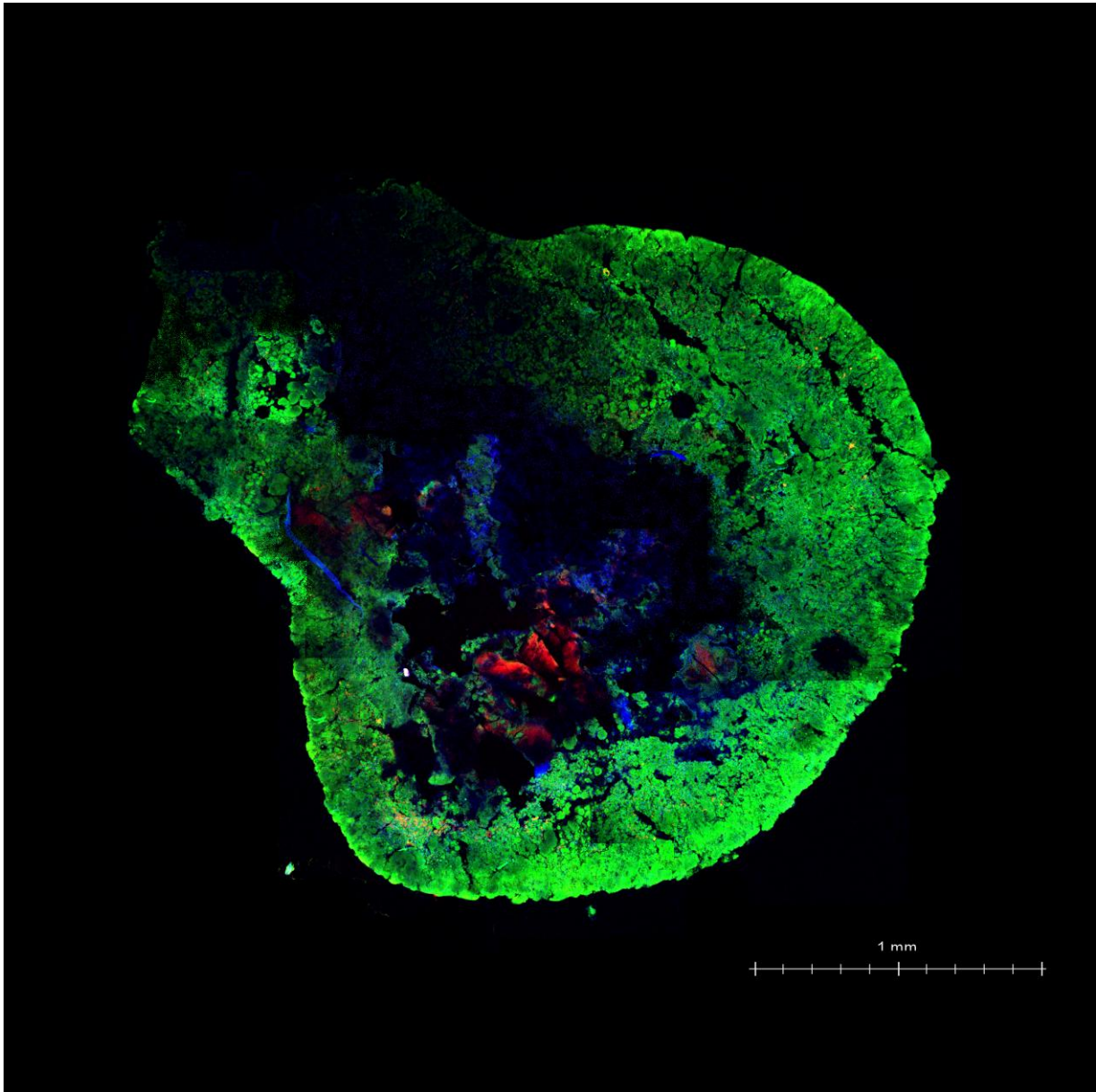


Figure 108 : Répartition des protéines et micro-organismes dans un granule de RI soumis à une contrainte hydrodynamique. Après incubation de 24 h à 35 °C dans le PBS 1X pH 7,5, le granule est incubé en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection de bactéries AOB (en vert) et par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les protéines sont marquées du FITC (en vert).

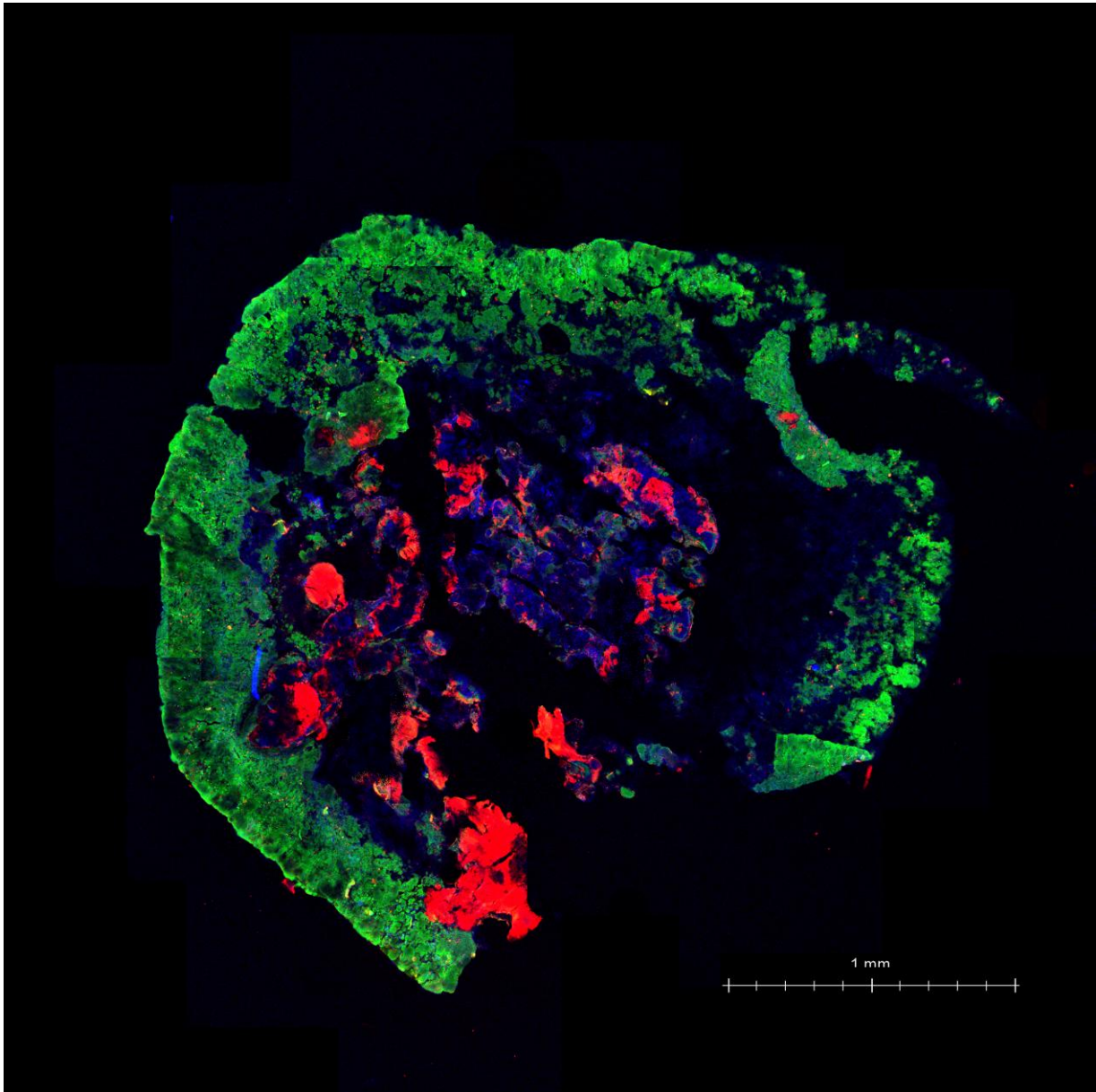


Figure 109 : Répartition des protéines et micro-organismes dans un granule de RI soumis à une contrainte hydrodynamique. Après incubation de 24 h à 35 °C dans le PBS 1X pH 7,5, le granule est incubé en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, puis marqué par une méthode FISH pour la détection de bactéries NOB (en vert) et par le DAPI pour la détection de l'ADN bactérien toutes espèces confondues (en bleu). Les protéines sont marquées du FITC (en vert).

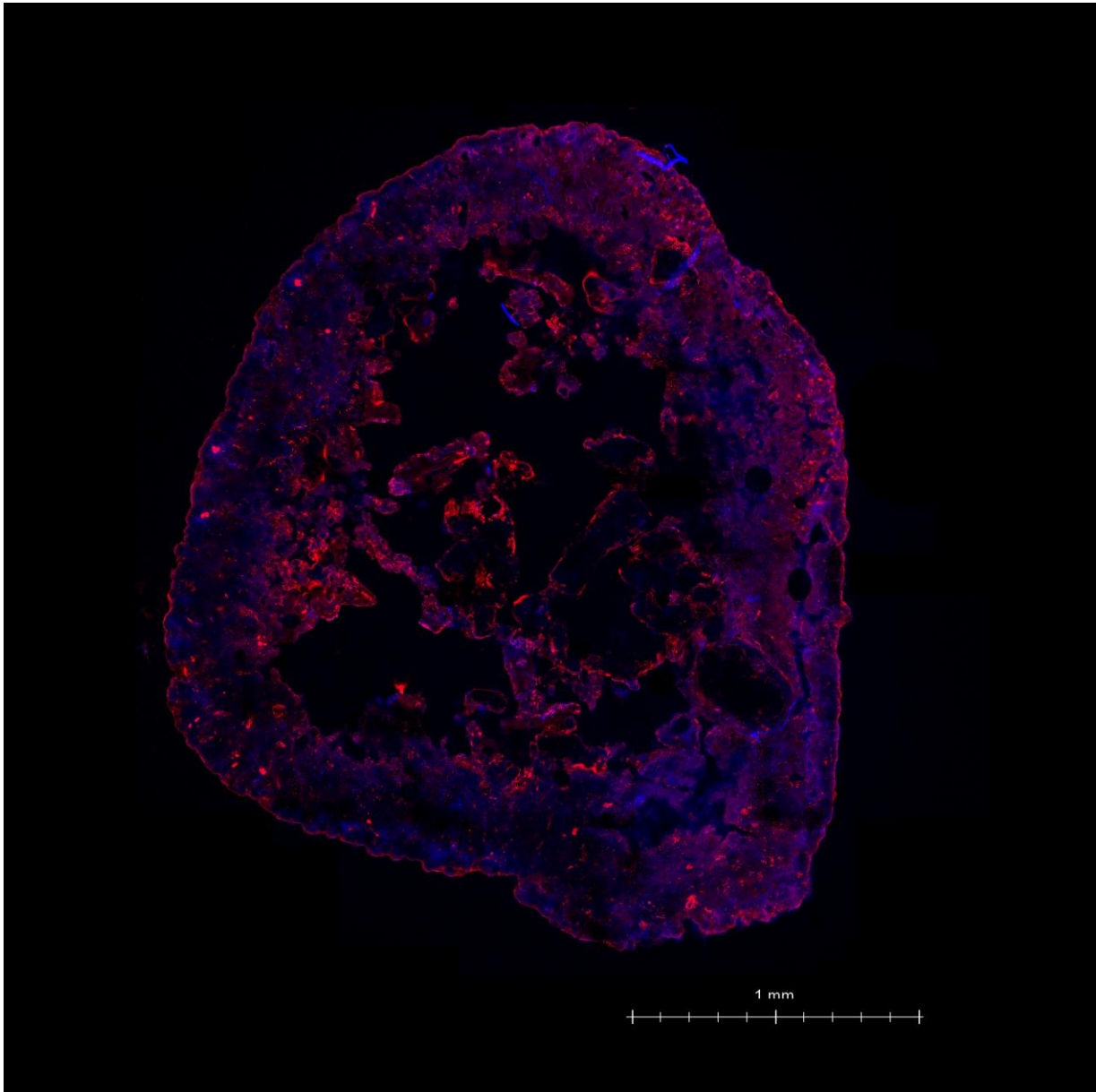


Figure 110 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de RI incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et à la concanavaline A en rouge.

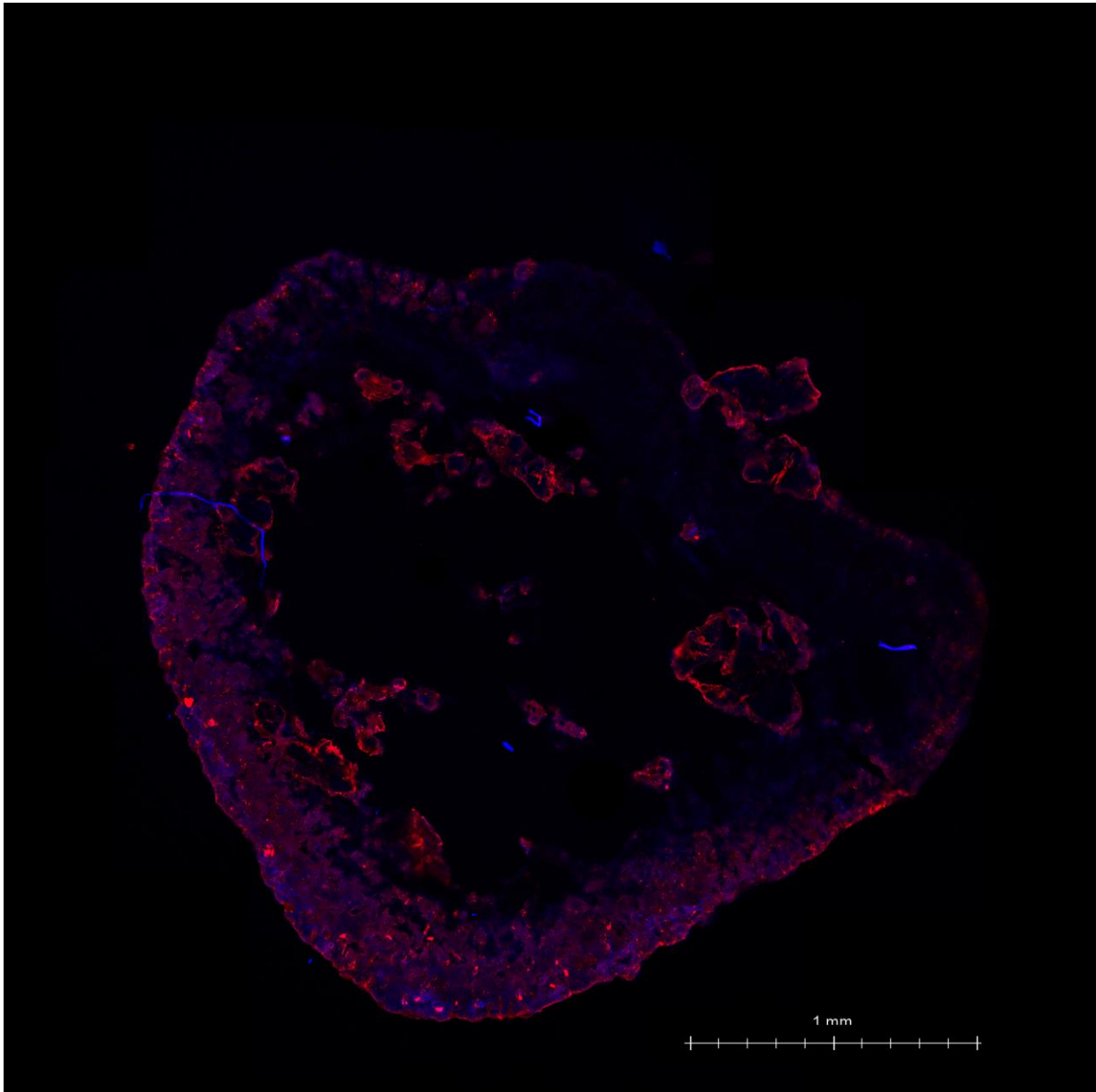


Figure 111 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de RI incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et à la concanavaleine A en rouge.

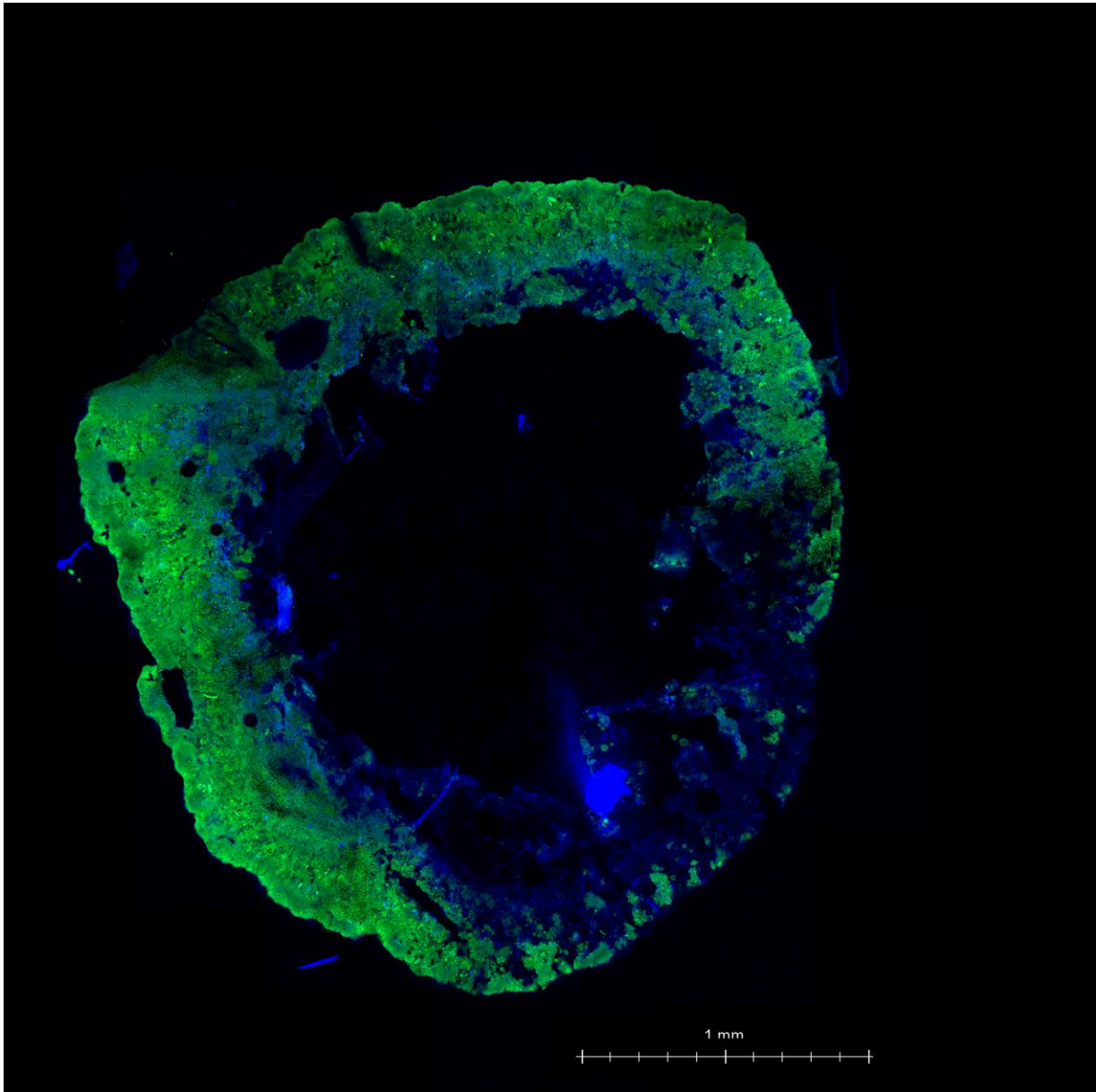


Figure 112 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et au FITC en vert.

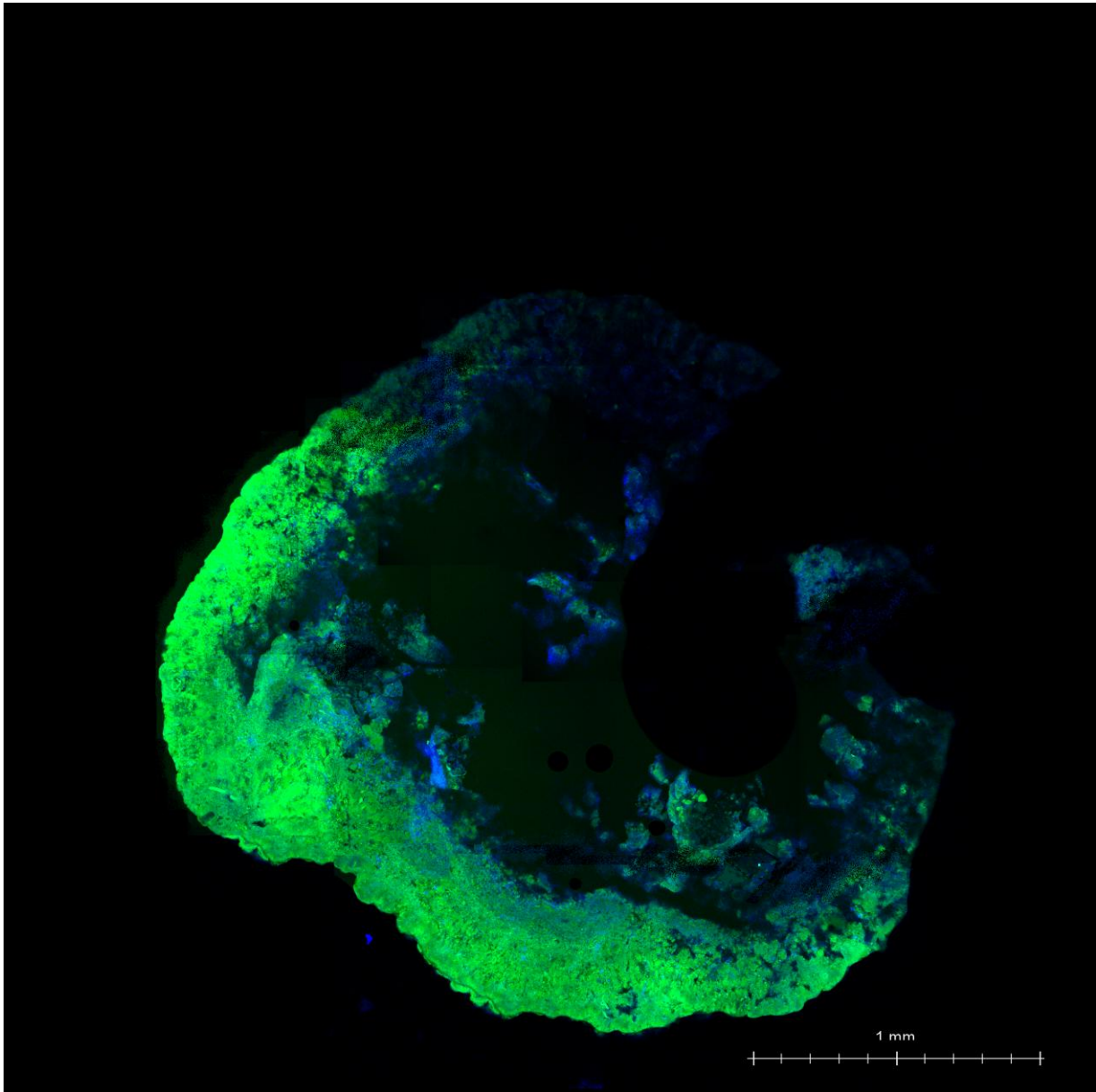


Figure 113 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l' α -amylase puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et au FITC en vert.

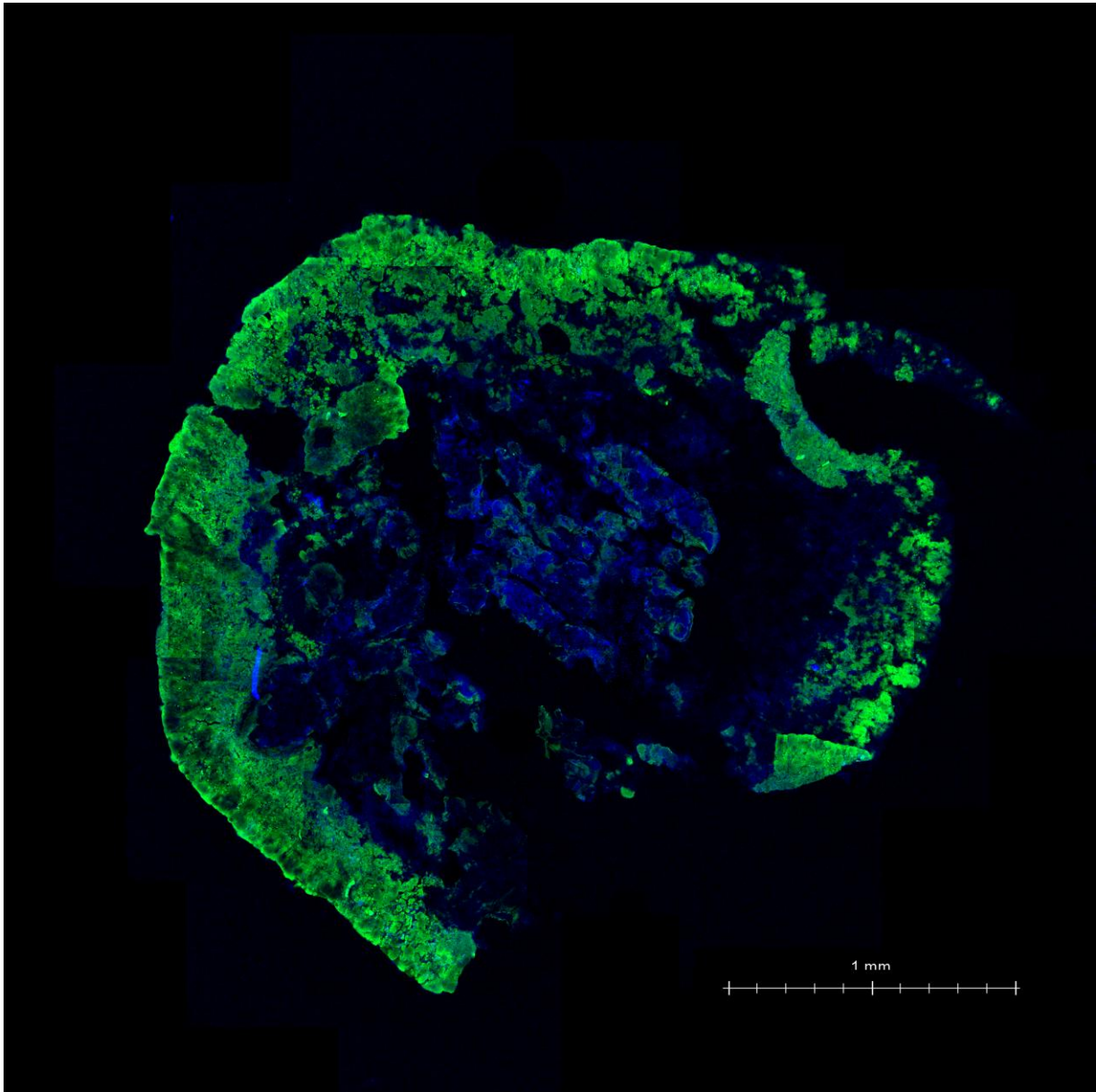


Figure 114 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et au FITC en vert.

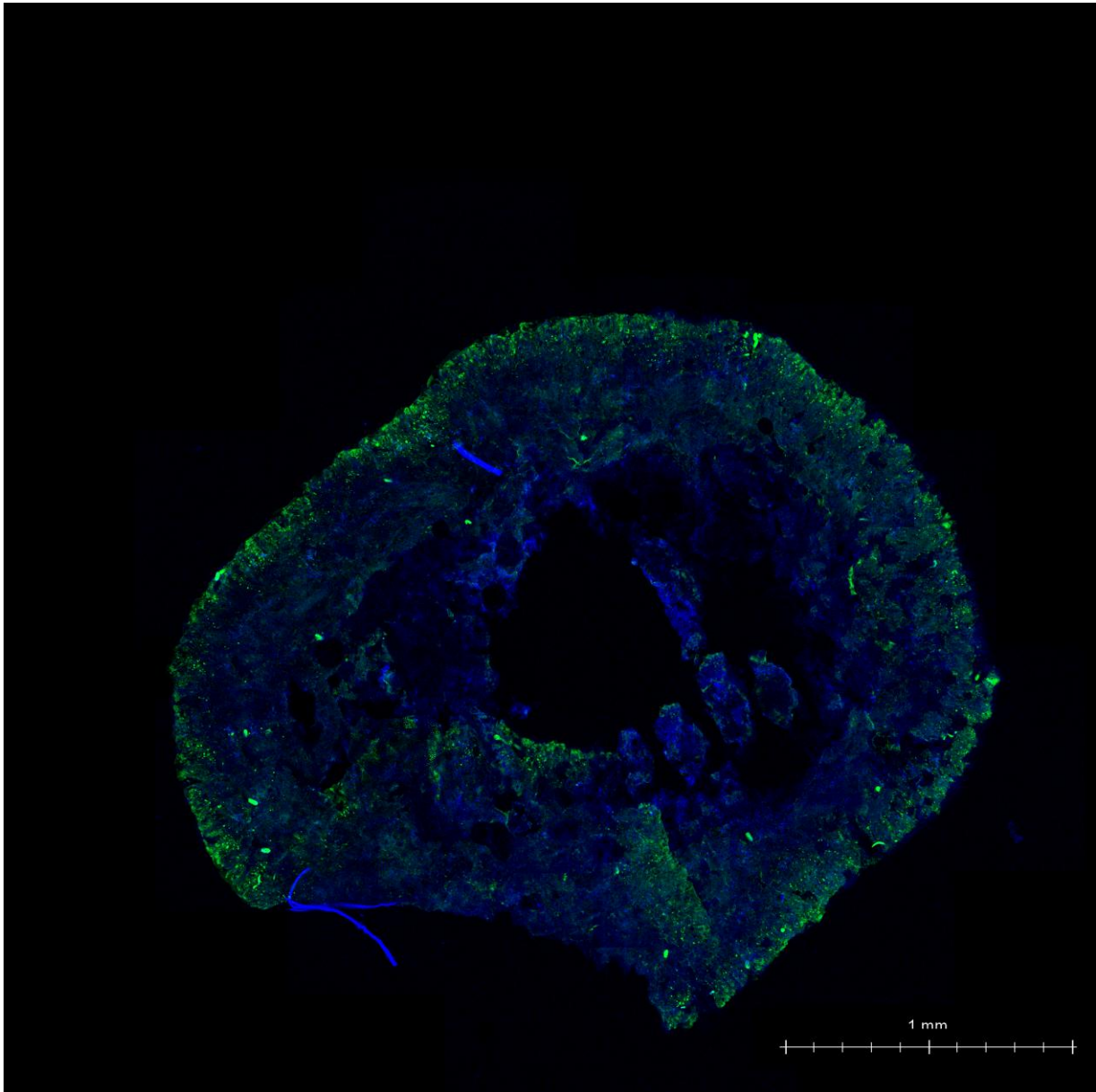


Figure 115 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et au FITC en vert.

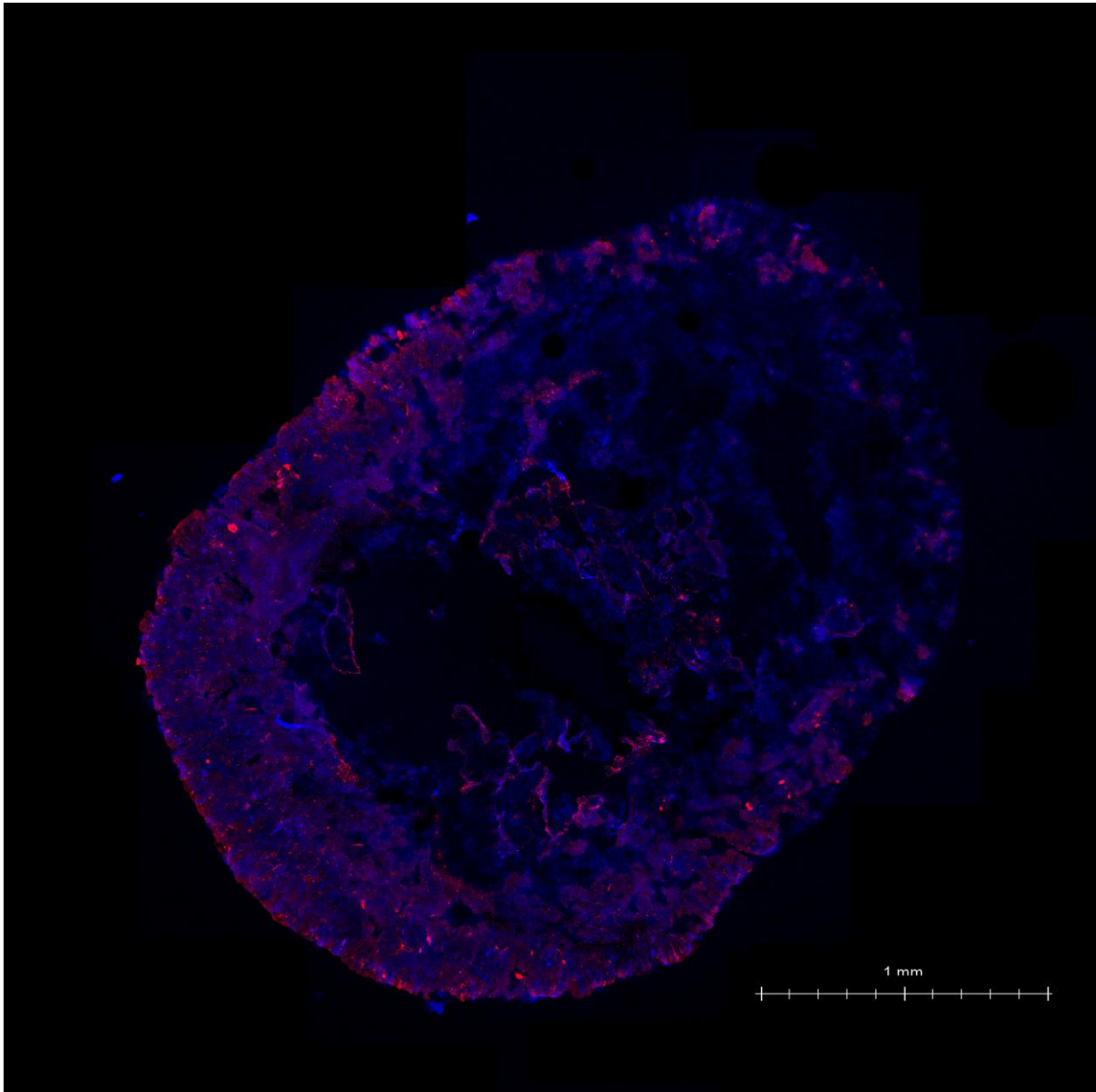


Figure 116 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et à la concanavaline A en rouge.

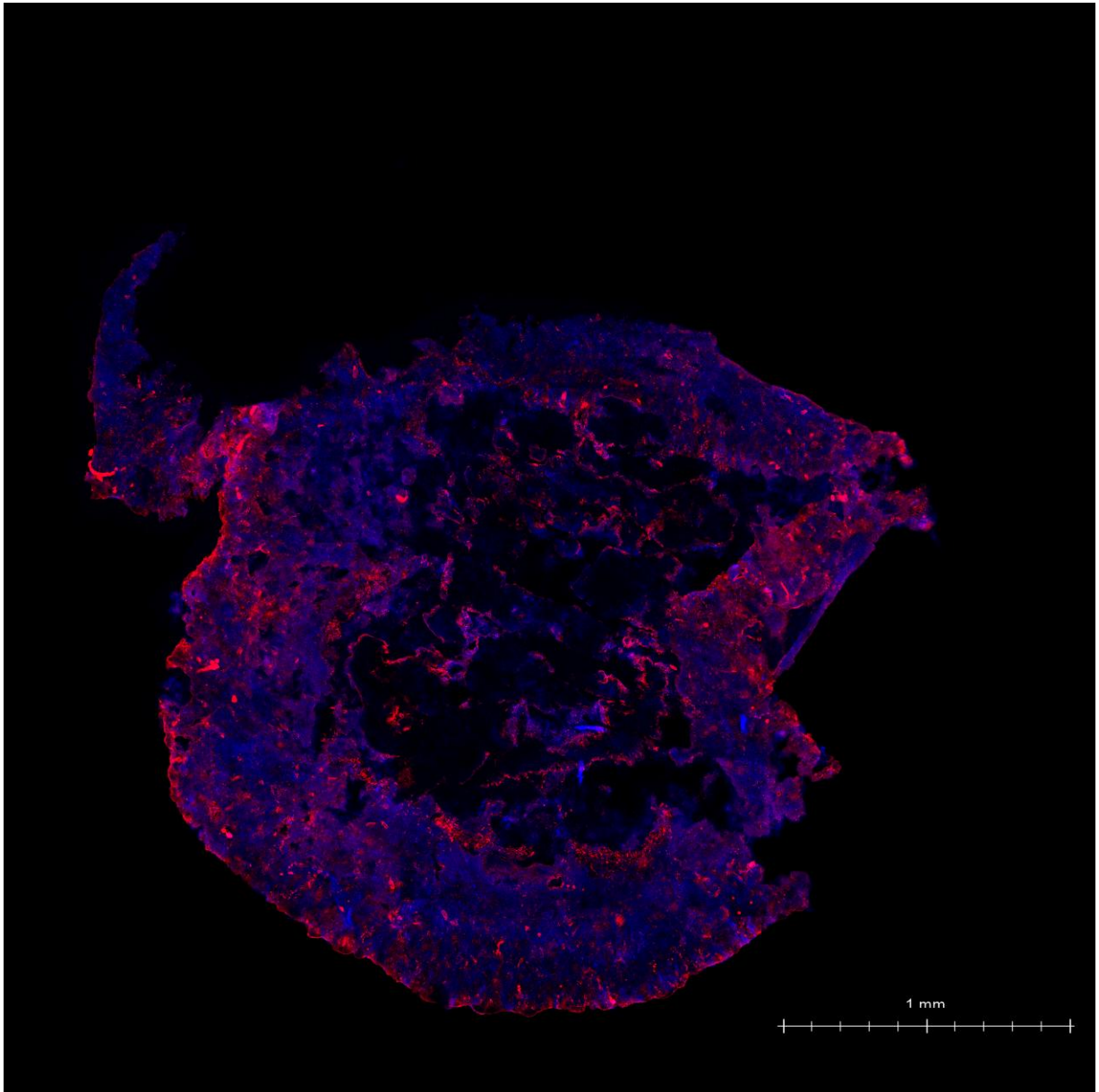


Figure 117 : Image vue en microscopie confocale d'un granule de R1 incubé 24 h à 35 °C dans de l'EDTA puis soumis à des contraintes hydrodynamiques en cuve de 100 mL agitée à 550 rpm pendant 20 min, coupé par un cryomicrotome, et enfin marqué au DAPI en bleu et à la concanavaline A en rouge.

Annexe 2 : Calcul du temps de pénétration à 90 % de la savinase dans les granules (t_{90})

On considère pour ce calcul que le rayon R des granules est de 1 mm. La température T du milieu (tampon PBS 1X) est maintenue à 35 °C (soit 308,15 K) et sa viscosité μ est approximativement de 0,001 Pa.s (c'est-à-dire la viscosité de l'eau). La savinase est une molécule de masse moléculaire $M = 27000$ Da, et on considère que sa densité ρ est identique à celle de l'eau, soit 1 000 000 g.m⁻³ car la molécule est parfaitement soluble aux concentrations utilisées.

D'après ces données, on déduit un rayon de stokes R_0 de la savinase tel que :

$$R_0 = \left(\frac{3M}{4\pi\rho Av} \right)^{1/3} = 2,2 \cdot 10^{-9} m$$

Où Av est le nombre d'Avogadro ($6,02214 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

Ce rayon de Stokes permet ensuite d'estimer le rayon hydrodynamique R_H de la molécule de savinase tel que $R_H = R_0$. Ceci permet de déduire le coefficient de diffusion D_w de la savinase dans un solvant liquide :

$$D_w = \frac{k_B T}{6\pi\mu R_H} = 1,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

Où k_s est la constante de Boltzmann ($1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$).

Dans le cas de la diffusion de la savinase dans les granules que nous étudions, on considère que le ratio entre le coefficient de diffusion de la savinase dans le granule (D_f) et dans un liquide (D_w) est de $D_f/D_w = 0,1$ donc $D_f = 1,0 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Et donc, dans le cas particulier de la savinase, la durée de pénétration à 90 % de la molécule dans les granules est de $t_{90} = 0,37 R^2/D_f = 10 \text{ h et } 2 \text{ min.}$