

# Université de Limoges

Ecole Doctorale Science – Technologie – Santé  
Faculté des Sciences et Techniques  
Groupement de Recherche Eau, Sol, Environnement

## THESE

pour obtenir le grade de  
**Docteur de l'Université de Limoges**  
**Discipline : Sciences de l'Environnement**  
N° 35

présentée et soutenue  
par  
**Isabelle BOURVEN**  
le 01 octobre 2012

*« Caractérisation de la fraction organique et minérale de la matrice extracellulaire issue de boues biologiques »*

Directeur de Thèse : Pr. Gilles GUIBAUD

### JURY

#### Rapporteurs :

Mme Elisabeth NEUHAUSER, Professeur, IUT Paul Sabatier, Université Toulouse III  
Mr Jean-Claude BLOCK, Professeur, Université de Lorraine

#### Examineurs :

Mr Michel BAUDU, Professeur, Université de Limoges  
Mr Philippe BRESSOLLIER, Professeur, IUT, Université de Limoges  
Mr Eric van HULLEBUSCH, Maître de conférences HDR, Université Paris-Est Marne-la-Vallée  
Mr Gilles GUIBAUD, Professeur, Université de Limoges

*A mes parents*

## **Remerciements**

**Je tiens à remercier vivement les rapporteurs de ce travail de thèse, les professeurs Elisabeth NEUHAUSER et Jean-Claude BLOCK.**

**Je remercie le laboratoire GRESE (Groupement pour la Recherche Eau Sol Environnement) pour m'avoir accueillie et particulièrement son directeur, le professeur Michel BAUDU.**

**Merci à mon Directeur de thèse, le professeur Gilles GUIBAUD pour son encadrement et sa patience.**

**Merci aux étudiants qui ont participé de manière directe ou non à une partie de ce travail : Romain METIVIER, Aurore LONGEVILLE, Guillaume BACHELLERIE.**

**Merci à l'ensemble du personnel du GRESE pour leur accueil et leur aide.**

Alors voilà, quand on a réussi à écrire un volume de pages suffisants pour caler le bureau d'un chercheur fou, c'est que c'est fini ! Ces 3 années de thèses sont j'espère une étape à bien d'autres dans le futur. Les étapes que l'on se donne aident finalement à accéder au bonheur (ce n'est pas moi qui le dit, c'est Platon) puisqu'on désire ce qu'on n'a pas encore et quand on l'a trop longtemps, on ne le désire plus. Trois ans c'est long tout de même !

Quand on rédige, une question existentielle se pose : mais ce que j'écris, à quoi ça sert ? Essayons d'être constructif : alors ça sert, heu.... au futur thésard qui s'inspirera pour sa biblio, à développer l'économie ou à creuser le déficit, comme on veut (et oui, l'ordinateur, l'électricité, le papier, l'encre), ça énerve (ou intéresse) les rapporteurs et les membres du jury et peut être que ça augmente la plasticité neuronale, à conditions d'en avoir un minimum....(de neurones !). Bref, tout ça pour dire, que rédiger 3 ou 4 articles devrait être suffisant et surtout les arbres en seraient bien soulagés !

Mais j'ai beaucoup appris pendant ces 3 ans, il faut dire que j'avais un chef (le professeur Gilles Guibaud) au top que je remercie vraiment....Je connais très peu de personne capable de travailler autant et aussi efficacement que lui, et c'est aussi un excellent formateur de chercheur. Pour ma formation scientifique, je remercie aussi François Bordas, toujours disponible et de bonne humeur, qui m'a expliqué posément et calmement les choses....Je remercie aussi Paul d'Abzac, heu....pour la biblio de sa thèse !! et pour son aide dès que je le sollicitais...

Je remercie le laboratoire GRESE de m'avoir donné la chance de faire une thèse : « avait-il misé sur le bon cheval ? » Merci au Directeur de laboratoire, le professeur Michel Baudu pour son « humanité » ....

Je remercie les étudiants qui sont passés, qui sont là, qui partiront....Je remercie Souad pour tous nos moments de délires dans la grotte du labo de microbio et pour sa gentillesse, pour nos manip la nuit où nous commençons à dériver sur une autre planète. Je remercie Marietta pour nos soutiens mutuels, pour notre sérieux parfois pour nos rires souvent.....

Je remercie mon compagnon, Jean-Luc, pour m'avoir souvent écouté (et oui je dénigrais souvent mon chef !!!) temporisé et guidé dans mes démarches.... Je remercie la maman de Jean-Luc pour sa gentillesse constante.

Je remercie Sonda, Nedjma, Gosia, Marion, Romain, Karine, Claudine, Kasia, Véro pour leur gentillesse et leur bonne humeur et les pauses café **plus** ou moins loooooooooongues (...avec Gosia et/ou Marion et/ou Sonda et/ Nedjma et/ou Romain et/ou ). Merci à mon Psy de labo, Charly !!!

Je remercie mes parents pour leur soutien, mon frère et sa femme qui nous ont traduit un article en vrai anglais ! ...ainsi que Cajoline !

Je remercie encore Gilles pour son soutien et les délires et le bonnet rouge ....

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>2</b>
<b>Partie A- Synthèse bibliographique.....</b>	<b>0</b>
<b>Chapitre A-1 : La MEC dans les biofilms des bioréacteurs de traitement des eaux usées 1</b>	
<b>1. La MEC des agrégats biologiques, origine et composition.....</b>	<b>8</b>
1.1. Mise en évidence de la MEC dans les agrégats biologiques.....	8
1.2. Localisation de la MEC dans les agrégats biologiques.....	8
1.3. Type de PEC et composition.....	9
1.4. Poids moléculaire des PEC .....	19
1.5. Origine et production de la MEC.....	21
1.6. De la nature de la MEC à la forme du biofilm.....	26
<b>2. Configuration des différentes formes de biofilms .....</b>	<b>27</b>
2.1. Les agrégats issus de biofilm sous forme de microcolonies .....	28
2.2. Les agrégats issus de boues activées sous forme de floc .....	29
2.3. Les agrégats issus de boue granulaire sous forme de granule.....	30
<b>3. Rôle de la MEC dans les agrégats biologiques impliqués dans le traitement des eaux usées .....</b>	<b>33</b>
3.1. Rôle de la MEC dans l'agrégation et la stabilité des biofilms .....	33
3.2. Impacts de la MEC dans les bioprocédés de traitement des eaux usées des stations d'épuration .....	41
<b>Chapitre A-2 : Méthodes d'extraction de la MEC .....</b>	<b>43</b>
<b>1. Procédure d'obtention de la MEC à partir des boues .....</b>	<b>44</b>
<b>2. Evaluation de la méthode d'extraction.....</b>	<b>45</b>
2.1. Rendement de la méthode d'extraction.....	45
2.2. Estimation de la lyse cellulaire .....	46
2.3. Evaluation de l'altération de la structure des PEC.....	48
<b>3. Choix de la méthode d'extraction .....</b>	<b>49</b>
3.1. Extraction de la MEC faiblement liée et de la MEC fortement liée .....	50
3.2. Extraction des PEC en fonction de leur polarité et charges .....	53
3.3. Extraction des PEC en fonction de la nature la classe de molécule organique .....	53
3.4. Extraction des PEC en fonction de la méthode de caractérisation des PEC.....	56
3.5. Extraction de la partie minérale de la MEC .....	54
<b>Chapitre A-3 : Méthodes de caractérisation de la MEC .....</b>	<b>58</b>

<b>1. Outils de caractérisation de la fraction organique de la MEC .....</b>	<b>59</b>
1.1. Dosage des protéines (et des substances humiques-like) par colorimétrie .	59
1.2. Utilisation de la fluorescence 3 dimensions pour la caractérisation des protéines-like et des substances humiques-like.....	61
1.3. Méthode de séparation des PEC en fonction de la taille.....	64
<b>2. Outils de caractérisation de la fraction minérale de la MEC.....</b>	<b>69</b>
2.1. Analyse de groupes chimiques fonctionnels par spectrométrie d'adsorption infrarouge (IR).....	70
2.2. Analyse micro morphologique <i>in situ</i> par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une microsonde de dispersion aux rayons X .....	71
<b>Conclusion de l'étude bibliographique.....</b>	<b>73</b>
<b>Partie B : Matériels et méthodes.....</b>	<b>76</b>
<b>Chapitre B-1 : Appareillages et produits .....</b>	<b>77</b>
1. Appareillages .....	78
2. Produits .....	79
<b>Chapitre B-2 : Méthodes.....</b>	<b>82</b>
1. Origine de la matrice extracellulaire (MEC) .....	83
1.1. Origine des boues.....	83
1.2. Méthode d'extraction de la matrice extracellulaire à partir des boues .....	84
2. Caractérisation classique des boues et de la matrice extracellulaire.....	87
2.1. Détermination du poids sec et du poids sec volatil.....	87
2.2. Détermination de la quantité de carbone organique total (COT).....	88
3. Méthode d'analyse de la matrice extracellulaire.....	88
3.1. Analyse de la matière minérale.....	88
3.2. Analyse de la matière organique.....	90
<b>Partie C : Résultats.....</b>	<b>97</b>
<b>Chapitre C-1 : Analyse de l'impact de la méthode d'extraction des PEC à partir des boues sur le profil massique des PEC .....</b>	<b>98</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>99</b>
<b>Article: Influence of the method used to extract EPS from wastewater sludges on their fingerprints obtained by Size Exclusion Chromatography.....</b>	<b>101</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>127</b>
<b>Chapitre C-2 : Etude de la fraction minérale de la MEC issue de boues activées .....</b>	<b>129</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>130</b>
<b>Article: Characterisation of the mineral fraction in extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludges extracted by eight different methods. ...</b>	<b>131</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>154</b>
<b>Chapitre C-3 : Développement d'outils analytiques en vue de l'étude de la fraction protéique et de la fraction humique-like des PEC issus des boues biologiques utilisées dans le traitement des eaux usées.....</b>	<b>156</b>

<b>Introduction .....</b>	<b>157</b>
<b>Article: Protein fraction extracted with EDTA from sludges: investigation of other analytical methods.....</b>	<b>159</b>
<b>Article: Interest of fluorescence detection to determine Proteins and Humic-like substances fingerprints of ExoPolymeric Substances (EPS) from biological sludges performed by Size Exclusion Chromatography (SEC).....</b>	<b>190</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>215</b>
Article 1	215
Article 2	216
<b>Chapitre C-4 : Etude de la fraction protéique des PEC issus de boue granulaire anaérobie .....</b>	<b>218</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>219</b>
<b>Evidence of glycoproteins and sulfated proteoglycan-like presence in EPS from anaerobic granular sludge: Possible implications for interactions between granular components .....</b>	<b>220</b>
<b>Flemming, H.C., Wingender, C., 2010. The biofilm matrix. Nat. Rev. Microbiol. 8, 623-633.....</b>	<b>233</b>
<b>Zhang, T., Fang, H.H.P., 2004. Distribution of extracellular polysaccharides in anaerobic granular sludges. Water Environ. Manage. 69, 153-158.....</b>	<b>236</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>237</b>
<b>Partie D : Conclusions et perspectives .....</b>	<b>238</b>
<b>Chapitre D-1 : Altérations/modifications induites sur la MEC par les méthodes d'extraction de la MEC à partir de boues biologiques .....</b>	<b>239</b>
<b>Chapitre D-2 : Développement et apport de nouveaux outils de caractérisation de la MEC issue des boues biologiques.....</b>	<b>243</b>
1. Fraction minérale de la MEC.....	244
2. Fraction organique de la MEC .....	245
3. Caractérisation des glucides de la fraction protéique.....	249
<b>Chapitre D-3 : Vers un modèle moléculaire de la matrice des boues granulaires anaérobies.....</b>	<b>252</b>
<b>Chapitre D-4 : Perspectives .....</b>	<b>255</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>258</b>
<b>Liste des Publications et Communications .....</b>	<b>281</b>

# Table des figures

## Partie A- Synthèse bibliographique

<b>Figure A.1</b> : modèle des PEC liés et solubles .....	9
<b>Figure A.2</b> : les carbohydrates de la MEC.....	13
<b>Figure A.4</b> : relation entre les acteurs impliqués dans la forme du biofilm.....	27
<b>Figure A.5</b> observation en microscopie confocale d'une microcolonie bactérienne de biofilm issu d'une eau de rivière. Mise en évidence des $\alpha$ Proteobacteria.....	28
<b>Figure A.6</b> : observation en microscopie confocale d'une microcolonie bactérienne de biofilm issu d'une eau de rivière. Marquage de molécules organique. ....	28
<b>Figure A.7</b> : modèle de la structure des flocs dans les boues activées selon Jorand et al., 1995 (A) et selon Sheng et al., 2006a (B).....	30
<b>Figure A.8</b> : image de granule marqué et observé au microscope confocal à balayage laser (Abreu et Alves, 2007). ....	31
<b>Figure A.9</b> : image d'un granule aérobie marqué et observé en microscopie confocale à balayage laser (Adav et Lee, 2008).....	31
<b>Figure A.10</b> : modèle de la structure de granules aérobies selon Caudan (2012).....	32
<b>Figure A.11</b> : modèle schématique des interactions entre les molécules de la MEC issue de boues activées (Higgins et Novak, 1997).....	40
<b>Figure A.12</b> : modèle schématique des molécules de la MEC participant à l'interaction des cellules (a) et exemple d'interaction moléculaire entres motifs glucidiques (b) (Flemming et Wingender, 2010). ....	41
<b>Figure A.13</b> : représentation schématique du colmatage des membranes dans un bioréacteur à membrane (Ni et al., 2011).....	42
<b>Figure A.14</b> : localisation de certains composés organiques en matrice de fluorescence 3D : 5 régions définies (Chen et al., 2003).....	62
<b>Figure A.15</b> : localisation des maxima de fluorescence des proteines-like , des « soluble microbial by product-like » et des substances humiques-like de MEC issus de différents types de boue. ....	63

## Partie C : Résultats

### Chapitre C-1 : Analyse de l'impact de la méthode d'extraction des PEC à partir des boues sur le profil massique des PEC

<b>Figure 1</b> : Fingerprints of EPS (GS Ne: (A), ANS Re: (B), AS Li: (C)) at 210 nm, extracted by five physical methods .....	112
<b>Figure 2</b> : Fingerprints of EPS (GS Ne: (A), ANS Re: (B), AS Li: (C)) at 210 nm, extracted by various chemical methods: .....	113
<b>Figure 3</b> : Consequences of the heating extraction treatment used on EPS extracted with centrifugation.....	116
<b>Figure 4</b> : Consequences of the chemical extractant used on EPS fingerprints (EDTA on AS Li: (A), Glutaraldehyde on AS Li: (B), Formaldehyde on GS Ne (C1) and albumin (C2): (C), NaOH and Formaldehyde on insulin (D2) and AS Li (D1): (D) .....	120

### Chapitre C-2 : Etude de la fraction minérale de la MEC issue de boues activées

<b>Figure 1</b> : percentage of mineral fraction of sludges and EPS extracts, extracted from the two activated sludges.....	137
<b>Figure 2</b> : comparison of major elements (A) and trace elements (B) content in sludge and their respective EPS extracted by centrifugation .....	139

<b>Figure 3:</b> major elements (1) and trace elements (2) contents in EPS AS Am (A) and EPS AS Li (B) extracted by height methods.....	141
<b>Figure S1:</b> IR spectra of EPS AS Li sample .....	145
<b>Figure S2 :</b> examples of SEM images of EPS samples (1) and of the composition, in weight percent, of the inorganic phase assemblage (performed by EDX analysis) of EPS sample (2) from AS Li activated sludge extracted with heating (A), sonication (B), CER (C), combination of formaldehyde and NaOH (D).....	147

## **Chapitre C 3 : Développement d'outils analytiques en vue de l'étude de la fraction protéique et de la fraction humique-like des PEC issus des boues biologiques utilisées dans le traitement des eaux usées**

### **Article 1**

<b>Figure 1:</b> 3D fluorescence spectra of EPS extract at 25mg.L <sup>-1</sup> :of DW in a Phosphate buffer at pH 7.0±0.1) (A) EPS AS A centrifugation, (B) EPS AS L centrifugation, (C) EPS GS Ee centrifugation, (D) EPS GS Ne centrifugation, (E) EPS AS A EDTA, (F) EPS AS L EDTA (G) EPS GS Ee EDTA, (H) EPS GS Ne EDTA.....	169
<b>Figure 2:</b> Fingerprints of EPS extracted with EDTA and with centrifugation from the two types of sludges investigated (AS L and GS Ee) obtained with fluorescence EEM at 221 and 360nm	173
<b>Figure 3:</b> Fingerprints of EPS extracted with EDTA from the four sludges, obtained at three different fluorescence EEM.....	175
<b>Figure 4:</b> Protein of EPS extracted with EDTA from sludges separated with native PAGE electrophoresis (A) and SDS-PAGE electrophoresis (B). M are molecular weight markers. Proteins were silver stained .....	179
<b>Figure 5:</b> Glycoproteins of EPS (concentrated extracts with freeze-drying) extracted with EDTA from sludges separated on 1D SDS PAGE electrophoresis. M are molecular weight markers which consist of a commercial prestained standard protein mixture (Fermentas). Proteins were PAS stained.....	182

### **Article 2**

<b>Figure 1.</b> Fluorescence EEM (Excitation Emission Matrix of EPS in Phosphate buffer at pH 7.0 ± 0.1 extracted (A) AS-Am (B) AS-Lisa; (C) GS-Em; (D) GS-Smur. *(Region I and II – 250/380 nm for Aromatic proteins; IV - <250/380 nm for Soluble microbial by-products-like; V - <250/<380 nm for Humic-like substances.....	198
<b>Figure 2.</b> Peak maxima location from 3D EEM spectra for humic-like substances for EPS (a) EPS from Activated sludge (AS-Lisa) and (b) EPS from Anaerobic granular sludge (GS-Eer, GS-Smur, GS-Ned). .....	199
<b>Figure 3.</b> SEC chromatograms of EPS from activated sludge (AS-Liso) and anaerobic granular sludge (GS-Eer) with different detection mode (A) UV-Absorbance at 210 nm; (B) UV-Absorbance at 280 nm; (C) fluorescence (221 nm-350 nm) for Protein-like molecules and (D) fluorescence (345 nm-443 nm) for Humic like substances using a mobile phase (phosphate buffer (50 mM) with NaCl (150 mM) at pH 7.0 ± 0.1) at flowrate 0.5 mL.min <sup>-1</sup> with Superdex 200 10/300 GL column, Amersham Biosciences .....	201
<b>Figure 4.</b> SEC chromatograms of EPS from activated sludge (AS-Am; AS-Liso; AS-Lisa) with different detection mode (A) UV-Absorbance at 280 nm; (B) fluorescence (221 nm-350 nm) for Protein-like molecules and (C) fluorescence (345 nm-443 nm) for Humic like substances using a mobile phase (phosphate buffer (50 mM) with NaCl (150 mM) at pH 7.0 ± 0.1) at flowrate 0.5 mL.min <sup>-1</sup> with Superdex 200 10/300 GL column, Amersham Biosciences .....	204
<b>Figure 5.</b> SEC chromatograms of EPS from anaerobic granular sludge (GS-Em, GS-Eer, GS-Ned, GS-Smur) with different detection mode (A) UV-Absorbance at 280 nm; (B) fluorescence (221nm-350nm) for Protein-like molecules and (C) fluorescence (345nm-443nm) for Humic like substances using a mobile phase (phosphate buffer (50 mM) with NaCl (150 mM) at pH 7.0 ± 0.1) at flowrate 0.5mL.min <sup>-1</sup> with Superdex 200 10/300 GL column, Amersham Biosciences ..	205

**Figure 6.** SEC chromatograms of EPS from (A) activated sludges (AS-Am; AS-Liso; AS-Lisa) and (B) anaerobic granular sludge (GS-Em, GS-Eer, GS-Ned, GS-Smur) with fluorescence detection (345 nm-443 nm) for Humic like substances using a mobile phase (phosphate buffer (50 mM) with NaCl (150 mM) at pH 7.0 ± 0.1) at flowrate 1 mL.min<sup>-1</sup> with Agilent column, Bio SEC 100 Å.....207

## **Chapitre C-4 : Etude de la fraction protéique des PEC issus de boue granulaire anaérobie**

**Figure 1:** Protein of S-EPS and B-EPS extracted from two anaerobic granular sludges separated with SDS-PAGE electrophoresis. M is molecular weight prestained marker. Proteins were silver stained.....225

**Figure 2:** Glycoproteins of S-EPS and B-EPS extracted from two anaerobic granular sludges separated on SDS PAGE electrophoresis. M is molecular weight prestained marker.....227

**Figure 3:** Proteoglycan-like of S-EPS and B-EPS extracted from two anaerobic granular sludges separated on SDS PAGE electrophoresis. M is molecular weight prestained marker.....229

**Figure 4:** *Lycopersicum* lectin western blot assay on protein of S-EPS and B-EPS extracted from two anaerobic granular sludges (glucuronic acid residues are targeted) Proteins were first separated on SDS PAGE electrophoresis. M is molecular weight prestained marker.....230

**Figure 5:** depiction of various interactions between EPS species in the biofilm from Anaerobic granular sludge (adaptation of Higgin and Novak, 1997) .....233

## **Partie D : Conclusions et perspectives**

**Figure D.1:** empreintes SDS-PAGE/ Ag, des protéines des PEC issus d'une boue granulaire anaérobie et extraits par différentes méthodes..... 248

**Figure D.2:** : impact des méthodes « centrifugation » et « REC » sur les empreintes CES des PEC issus de deux type de boues -colonne Superdex, Amersham Biosciences, 200 10/300 [10-600 kDa]- (article 2 du chapitre C3)..... 249

**Figure D.3:** modèle des interactions moléculaires possibles entre les PEC issus de boues granulaires anaérobies (adaptation du modèle d'Higgins et Novak, 1997) ..... 253

# Table des tableaux

## Partie A- Synthèse bibliographique

<b>Tableau A.1</b> : exemples de concentrations en protéines, polysaccharides, substances humiques-like, acides uroniques, lipides et acides nucléiques de solutions de PEC extraits à partir de différentes biomasses.....	10
<b>Tableau A.2</b> : exemples de concentrations en protéines, polysaccharides et acides nucléiques de solutions de PEC extraits à partir de boues activées traitant différents effluents (Sponza, 2002)	11
<b>Tableau A.3</b> : fraction minérale de la MEC extraits par résine à partir de différentes biomasses et de différents effluents .....	11
<b>Tableau A.4</b> : masse moléculaire des différentes classes de molécules présentes dans les PEC.	20
<b>Tableau A.5</b> : rendement d'extraction en fonction du type de biofilm et du type d'extraction...	46
<b>Tableau A.6</b> : méthode d'extraction séquentielle de la MEC soluble, de la MEC faiblement et forment liée.....	50
<b>Tableau A.7</b> : modes d'action de différentes méthodes d'extraction de la MEC à partir de boues activées ou granulaires.....	52
<b>Tableau A.8</b> : exemple de composition biochimique des échantillons de PEC extraits à partir d'une boue activée et d'une biomasse granulaire anaérobie par différentes méthodes (Liu et Fang 2002b).....	54
<b>Tableau A.9</b> : fraction organique dans différentes boues et selon plusieurs méthodes d'extraction .....	55
<b>Tableau A.10</b> : les différentes méthodes de dosage colorimétrique des protéines .....	60
<b>Tableau A.11</b> : influence de composés chimiques sur le dosage des protéines par la méthode de Lowry (Smith et al., 1985).....	61

## Chapitre B : Matériels et méthodes

<b>Tableau B.1</b> : origine des différents matériels utilisés.....	78
<b>Tableau B.2</b> : origine des boues utilisées .....	84
<b>Tableau B.3</b> : les différentes méthodes d'extraction des matrices extracellulaires à partir des boues.....	85
<b>Tableau B.4</b> : banque de matrices extracellulaires utilisée pendant l'étude (x correspond aux extraits de MEC disponibles).....	87
<b>Tableau B.5</b> : caractéristiques des dosages colorimétriques utilisés pour la détermination de la composition biochimique des matrices extracellulaires .....	90
<b>Tableau B.6</b> : paramètres et calibration des colonnes CES utilisées .....	92
<b>Tableau B.7</b> : caractéristiques des électrophorèses utilisées pour l'étude des protéines de la MEC .....	94
<b>Tableau B.8</b> : coloration biochimique spécifique des PAGE .....	95
<b>Tableau B.9</b> : spécificités glucidiques des lectines et révélation des westerns blot des protéines des matrices extracellulaires séparées par SDS-PAGE .....	96

## Partie C : Résultats

### Chapitre C-1 : Analyse de l'impact de la méthode d'extraction des PEC à partir des boues sur le profil massique des PEC

<b>Table 1</b> : Origin and main characteristics of EPS .....	107
<b>Table 2</b> : organic fraction of EPS extracted in percentage of VDW/DW and EPS organic carbon content.....	109

## **Chapitre C-2 : Etude de la fraction minérale de la MEC issue de boues activées**

<b>Table 1:</b> main characteristics of WWTP, influent, effluent and sludge samples used for EPS extraction .....	133
---	-----

## **Chapitre C 3 : Développement d'outils analytiques en vue de l'étude de la fraction protéique et de la fraction humique-like des PEC issus des boues biologiques utilisées dans le traitement des eaux usées**

### **Article 1**

<b>Table 1:</b> Origin and main characteristics of sludges. ....	162
<b>Table 2:</b> Main characteristics of EPS extracted with EDTA and by centrifugation (centr) from sludges and after 0,22 $\mu$ m filtration. ....	167
<b>Table 3:</b> The fluorescence peak positions in the EEM (Excitation Emission Matrix) spectra of the EPS extracted from sludges by EDTA which are compared with data from DOM (Dissolved Organic Matter) and EPS available in the literature. ....	170
<b>Table 4:</b> Apparent MW (Molecular Weight) distribution in kDa determined by SEC with fluorescence (Ex/Em: 221/360nm) detection of the molecules comprising the four EPS extracted with EDTA .....	177
<b>Table 5:</b> Molecular weight in kDa of proteins from sludges EPS extracted by ETA separated on 1D Native or SDS-PAGE electrophoresis calculated with Gelanalyzer 2010. ....	180
<b>Table 6:</b> Molecular weight in kDa of denatured glycoproteins from sludges EPS extracted by EDTA separated on 1D SDS-PAGE electrophoresis calculated with Gelanalyzer2010. ....	183

### **Article 2**

<b>Table 1</b> Origin and main characteristics of EPS .....	194
---	-----

## **Chapitre C-4 : Etude de la fraction protéique des PEC issus de boue granulaire anaérobie**

<b>Table 1:</b> Main characteristics of soluble (S) and bound (B) EPS from two granular anaerobic sludges .....	223
<b>Table 2:</b> Glucidic specificity from lectins and antibodies (and their detection) used in the western blot assay on protein fraction of EPS. ....	224

## **Partie D : Conclusions et perspectives**

<b>Tableau D.1:</b> altérations de la fraction organique et minérale de la MEC provoquées par la méthode d'extraction .....	241
---	-----

## Abréviations

**ADN ou DNA** : acide désoxyribonucléique  
**ADNe, ADNi** : ADN extracellulaire, ADN intracellulaire  
**APS** : ammonium persulfate  
**ARN ou RNA** : acide ribonucléique  
**AS** : boue activée  
**ATP** : adénosine triphosphate  
**BAM ou MBR** : bioréacteur à membrane  
**BAP** : produit associé à la biomasse  
**BCA** : acide bicichoninique  
**CES ou SEC** : chromatographie d'exclusion stérique  
**CLSM** : microscopie confocale à balayage laser  
**Con A** : concanavaline A  
**COT ou TOC** : carbone organique total  
**DGGE** : denaturing gradient gel electrophoresis  
**DVLO** : Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek  
**EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique  
**EEM 3D** : spectroscopie de fluorescence en 3 dimensions utilisant une matrice de fluorescence excitation / émission  
**EGSB** : expanded granular sludge  
**Em/Ex** : longueur d'onde d'excitation / longueur d'onde d'émission  
**FFF** : fractionnement par couplage flux-force  
**FITC** : fluoréscéine isothiocyanate-5  
**FTIR** : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier  
**G6P-DH** : glucose 6 phosphate déshydrogénase  
**GFC** : chromatographie par filtration sur gel  
**GP** : glycoprotéine  
**GS** : boue granulaire  
**HPLC** : chromatographie liquide à haute pression ou haute performance  
**HPSEC** : chromatographie d'exclusion stérique à haute pression

**ICP-AES** : plasma inductif couplé à un spectromètre d'émission atomique  
**ICP-MS** : plasma inductif couplé à un spectromètre d'émission optique  
**IF** : spectroscopie infrarouge  
**KDO** : 2-céto-3-désoxyoctanate  
**LC MS** : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse  
**MEB DRX** : microscope électronique à balayage équipé d'une microsonde X dispersive en énergie  
**MES ou TSS** : matières en suspension  
**MM** : masse moléculaire  
**MVS ou VSS** : matières volatiles en suspension  
**NBT/BCIP** : Nitrobleu de tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3'indolyphosphate  
**PAS** : coloration à l'acide périodique, et réactif de Schiff  
**PEC ou EPS** : polymère extracellulaire  
**PG** : protéoglycane  
**PM ou MP** : phase mobile  
**PMS ou SMP** : produit microbien soluble polyacrylamide  
**PS ou DW** : poids sec  
**PVS ou VDW** : poids sec volatil  
**REC ou CER** : résine échangeuse de cations  
**SBR** : traitement en réacteur par séquence  
**SDS PAGE** : électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate  
**STEP** : station d'épuration à boues activées  
**TBS** : solution de tampon Tris-base  
**TBS-T** : solution de tampon Tris-base – Tween 20  
**TEMED** : Tetramethylethylenediamine  
**UAP** : produit associé à l'utilisation des substrats  
**UASB** : upflow anaerobic sludge blanket  
**V** : volume

# **Introduction**

Les zones urbaines, les secteurs agricoles et industriels sont responsables d'une pollution de l'environnement. Ainsi, les eaux usées contaminées en matière organique principalement, se retrouvent dans les eaux naturelles (nappes phréatiques, rivières). L'enrichissement en substances organiques et/ou minérales induit un développement anormal des microorganismes entraînant une diminution de la teneur en oxygène de l'eau, à l'origine de la morbidité ou mortalité de la faune aquatique. Par ailleurs cette pollution peut aussi entraîner le développement de microorganismes toxiques (cyanobactérie) en zone côtière. Face à ce risque écologique et sanitaire, une meilleure gestion des eaux de rejet usées s'impose. Les directives ERU (traitement des eaux résiduaires urbaines 91/271/CEE) ou DCE (cadre sur l'eau du 23 octobre 2000 (directive 2000/60)) obligent les états de la CEE à se préoccuper du devenir de leurs eaux usées. Ainsi, en France, la loi du 10 juillet 2008 a fixé le bon état écologique de l'eau et des milieux aquatiques à atteindre avant 2015.

L'une des voies les plus employées pour traiter les eaux usées est la dégradation des polluants organiques et/ ou minéraux par voie biologique. Le traitement s'effectue grâce à un concentré de microorganismes (biomasses) maintenues dans un réacteur. Le principe du traitement des eaux repose sur le procédé de traitement biologique et sur la séparation physique de la biomasse épuratrice et de l'eau épurée. Il existe deux classes majeures de procédés biologiques couramment utilisés: les procédés à cultures libres et les procédés à cultures fixes.

Le procédé à culture libre (boue activée) est basé sur les travaux d'Arden et Lockett (1914). Les eaux usées sont soumises à une aération continue. Celle-ci est réalisée par un brassage permanent dans le bassin d'aération. Les microorganismes, (bactéries essentiellement, protozoaires, algues microscopiques...), s'organisent en agrégat appelé « floccs » (Urbain et al., 1993). Ce brassage permet également le maintien des floccs en suspension. (Metcalf et Eddy, 2003). 60% des stations d'épuration françaises utilisent ce principe. Le procédé comporte 3 étapes.

- Une étape aérobie où les microorganismes en suspension vont se développer en consommant la matière organique carbonée et en la transformant en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Lors de cette étape, l'azote ammoniacal est en grande partie oxydé en nitrate.
- Une étape de sédimentation où le bassin est laissé au repos afin de laisser décanter

les floccs formés. C'est une étape cruciale dans le procédé à boue activée. Elle permet la séparation de la matière en suspension et ainsi définira la qualité de l'effluent de la station d'épuration (STEP) (Jenkins et al., 1986; Grady et al., 1999).

- Une dernière étape où une partie de la boue est recircularisée afin de réensemencer le bassin d'aération. Le reste est un déchet et est envoyé dans la filière de traitement des boues.
- Les boues conditionnées (déshydratées,... ) sont incinérées ou peuvent être utilisées pour l'épandage agricole.

Les dysfonctionnements rencontrés notamment au niveau de la décantation ont facilité l'émergence de techniques de substitution telles que les bioréacteurs à membranes (BAM).

Ces systèmes couplent une dégradation biologique par des biofilms sous forme de flocc, à une séparation par membranes d'ultra ou de microfiltration: les micro-organismes oxydent et/ou assimilent la pollution organique (voire azotée) entrante et sont totalement séparés de l'eau traitée grâce à la membrane. Des biofilms se développent aussi au niveau de la membrane filtrante ce qui augmente la capacité épuratoire du système.

Les procédés à culture fixe utilisent des réacteurs où la boue est sous forme granulaire. Les granules sont des agrégats bactériens de formes sphériques denses qui peuvent être assimilés à des biofilms particuliers (Liu et Tay, 2004). Le principal intérêt de l'utilisation des boues granulaires réside dans la grande capacité de celles-ci à dégrader la matière organique de l'effluent. En anaérobie, la dégradation de la matière organique est accompagnée d'une production de méthane (O'Flaherty et al., 2006), ce qui représente un intérêt économique important pour la fourniture d'énergie. Des bactéries et archées méthanogènes sont majoritairement retrouvées dans les granules anaérobies (McHugh et al., 2003). Les réacteurs utilisés avec ces biomasses sont de type UASB (Upflow anaerobic sludge blanket) ou EGSB (expanded granular sludge bed). Les procédés granulaires anaérobies permettent en outre de pallier au problème d'élimination des déchets (boues) issues des STEPs, étant donné que les microorganismes méthanogènes génèrent moins de biomasse. Par ailleurs dans le cas des granules aéro/anaérobie, l'augmentation de la compacité en biomasse permet de diminuer aussi les volumes de boue produite. Les granules sont plus résistants que les floccs et l'étape de

séparation solide/liquide est accélérée.

Ainsi, à chaque type de procédé correspond une forme d'agrégat de microorganismes spécifique. Chaque procédé présente des étapes à optimiser. Les floccs des boues activées ont une faible densité et donc une décantabilité lente alors que les boues granulaires, plus denses ont une vitesse de décantation plus élevée. La densité et donc la décantation des floccs est aussi plus faible en cas de prolifération anormale de bactéries filamenteuses (Kämpfer et al., 1995). Le colmatage ou encrassement des membranes est l'inconvénient majeur des bioréacteurs à membranes (Stephensen et al., 2000). Enfin, le processus de granulation (qui peut durer deux mois pour les boues granulaires anaérobies) et la stabilisation de l'état granulaire restent encore à maîtriser.

L'étude de la structure des floccs permet de mieux appréhender le comportement physique des floccs et peuvent par conséquent fournir des données intéressantes quant à la qualité de la boue. De plus, outre des phénomènes purement physiques impliqués dans le processus de floculation, la composition biochimique des floccs et la variation des conditions environnantes du milieu dans lequel ils évoluent, jouent un rôle prépondérant dans leur constitution et s'expriment à travers la notion de biofloculation. De même, la compréhension de l'impact sur la structure du granule et des facteurs impliqués dans la granulation permettra une maîtrise du procédé à réacteur à culture fixe. Les paramètres à maîtriser sont complexes à identifier du fait du caractère intégratif du biofilm (variation microbiologique, physico-chimique, plastique). En effet la nature du procédé, les conditions physico-chimiques (température, pH...) et la nature chimique de l'effluent impactent le biofilm.

L'agrégat est une matrice ou biofilm où les microorganismes sont maintenus et structurés par un « ciment », la « matrice extracellulaire » (MEC). Celle-ci est formée de polymères extracellulaires (PEC) et de minéraux sous forme soluble et particulaire (précipité). Les PEC sont composés majoritairement de protéines, substances humiques-like, glucides et acides uroniques (Liu et Fang 2002a ; Sponza, 2003). Pour les formes flocculantes des STEPs, Frølund et al., (1996) estiment que les PEC représentent environ 20 à 25 % des MES (matières en suspension) alors que pour les granules anaérobies, les PEC représentent de 0,3 à 27% de la masse sèche des granules (Schmidt et Ahring, 1996 ; Vivanco et al., 2006). Les

recherches sur les biofilms ont mis en évidence que les PEC ont une contribution importante dans la structure, la défense et la nutrition des biofilms (Brown et Lester, 1982; Wingender et al., 1999). L'étude des PEC permettra de mieux appréhender la formation et l'organisation de ces biofilms. Ainsi Liu et al. (2004b), Mc Swain et al. (2005) montrent que le développement de population bactérienne à faible taux de croissance et producteur de PEC est favorable à la granulation. Les PEC sont aussi reportés dans de nombreuses études comme favorisant la formation et la croissance des floccs par agglomération des bactéries entre elles (Sponza, 2003). Par ailleurs, la MEC est responsable de l'encrassement des bioréacteurs à membranes. L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre la structure moléculaire des biofilms épuratoires à l'issue de l'étude des caractéristiques de MEC issues de différents types de biofilm épuratoire.

L'étude de la MEC nécessite dans un premier temps son extraction. Il existe de nombreux protocoles d'extraction dans la littérature mais le choix d'un protocole de référence n'existe pas pour les boues activées (Comte et al., 2006a) ni pour les granules anaérobies (D'Abzac et al., 2010a). Ces auteurs montrent que la méthode d'extraction impacte la quantité et la nature de la MEC (organique (floc et granule) et minérale (granule anaérobie)). Il est admis cependant qu'une méthode d'extraction douce ne déstabilisera pas ou peu le biofilm et permettra d'extraire la MEC faiblement liée aux microorganismes du biofilm (« PEC solubles ») alors qu'une méthode physique ou chimique plus énergétique induira une meilleure dispersion du biofilm et permettra d'extraire la MEC plus fortement liée ou proche des microorganismes (« PEC liés ») (Wingender et al., 1999). Une première partie de ces travaux consistera à compléter cette étude. L'importance de la fraction minérale mise en évidence dans les boues granulaires par D'Abzac et al. (2010b) sera ainsi explorée sur les boues activées afin de mieux comprendre l'interaction entre les PEC et les éléments inorganiques. L'impact de la méthode d'extraction sur la fraction minérale sera aussi envisagé. De même, cet impact sera analysé sur les molécules organiques issues d'une banque de MEC extraites de différentes boues activées et boues granulaires anaérobies. Des méthodes novatrices ont par la suite été explorées en vue d'une caractérisation plus spécifique des PEC. Ce travail s'appuie sur les formes solubles et liées des PEC. Ainsi les différentes explorations de techniques d'analyse ont d'abord permis une évaluation des masses moléculaires des protéines et des substances humiques-like des PEC. Ensuite une exploration spécifique des

protéines des PEC a été mise en œuvre (nature et masse moléculaire). La caractérisation de la fraction protéique des PEC permettra de mieux appréhender les interactions des protéines avec les autres acteurs du biofilm.

Les méthodes expérimentales utilisées pendant cette étude seront décrites dans la partie II de la thèse.

Les résultats expérimentaux sont présentés (Partie III) sous forme d'articles répartis en quatre chapitres.

Une conclusion générale (Partie IV) reprend les bilans scientifiques des quatre chapitres expérimentaux et met en avant des avancées apportées par ce travail.

Une synthèse bibliographique (Partie I) fait un état des lieux des recherches concernant les MEC issues des boues activées et des boues granulaires anaérobies.

# **Partie A- Synthèse bibliographique**

*Chapitre A-1 : La MEC dans les biofilms des  
bioréacteurs de traitement des eaux usées*

---

## **1. La MEC des agrégats biologiques, origine et composition**

### **1.1. Mise en évidence de la MEC dans les agrégats biologiques**

Dans le traitement biologique des eaux usées, les microorganismes vivent très majoritairement sous forme d'agrégats tels que les biofilms. Le procédé de traitement des eaux usées implique des formes spécifiques de biofilm : les floccs pour les boues activées des stations d'épuration, les granules pour les bioréacteurs à lit fixe, et, sans forme spécifique, les biomasses fixées sur support. En microscopie électronique, la présence de polymères extracellulaires (PEC) enchevêtrés et emprisonnant les microorganismes (Jorand et al., 1995 ; Hulshoff Pol et al., 2004) est observée dans les floccs et les granules. Les PEC sont composés de protéines, substances humiques-like, glucides, acides uroniques, lipides et acides nucléiques (Liu et Fang, 2002a ; Sponza, 2003). Il faut ajouter, associé aux PEC, du matériel inorganique observé par Leppard et al. (2003) ; Laspidou et Rittman, (2002). De fait, il est préférable de nommer « MEC » (matrice extracellulaire) l'ensemble des composés organiques et minéraux situés à l'extérieur des cellules. Certaines caractéristiques attribuées aux PEC doivent ainsi parfois être attribuées à la MEC.

### **1.2. Localisation de la MEC dans les agrégats biologiques**

Omoike et Chorover, (2004) ont défini les PEC (polymères extracellulaires) ou EPS (extracellular polymer secreted) comme un mélange complexe de macromolécules ayant des masses moléculaires et des propriétés structurales variables et se situant à l'extérieur des cellules dans les biofilms. La limite entre la matrice extracellulaire et la paroi bactérienne peut être discutée. Certains auteurs semblent exclure une partie de la matrice extracellulaire dans leur définition. Ainsi, Nielsen et Jahn, (1999) ont estimé que les polymères situés à l'extérieur de la paroi cellulaire et qui ne sont pas directement ancrés dans la membrane ou la paroi de peptidoglycane, sont des PEC.

## 1.3. Type de PEC et composition

### 1.3.1. Les PEC solubles et les PEC liés de la MEC

Les PEC ont été classés en fonction de leur attachement aux microorganismes (Nielsen et Jahn, 1999 ; Lapidou et Rittmann, 2002) (Figure A1).

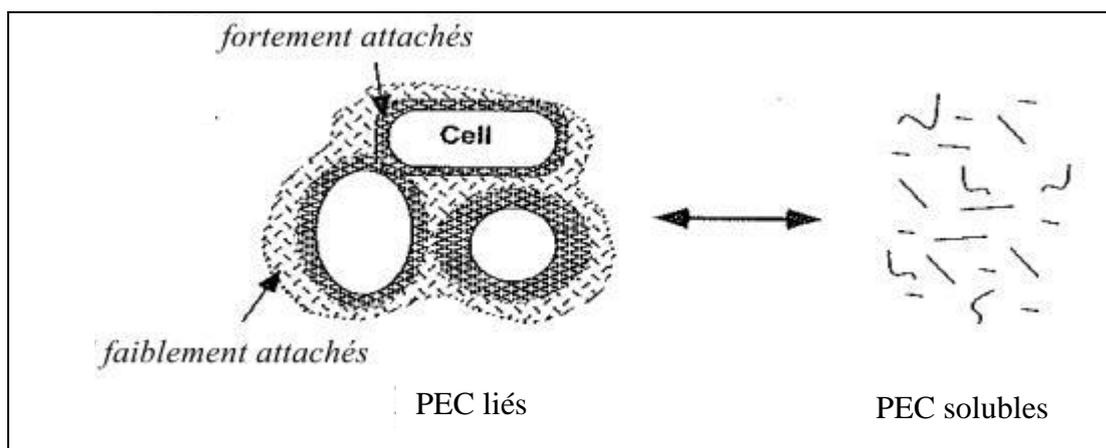


Figure A.1 : Modèle des PEC liés et solubles (Nielsen et Jahn, 1999).

### 1.3.2. Les PEC liés

Les PEC liés regroupent eux même deux catégories.

- Les PEC qui sont fortement liés aux enveloppes cellulaires ou très proches de celles-ci. Ceux-ci regroupent par exemple :
  - le glycocalix : le glycocalix est une couche de biopolymères entourant la cellule bactérienne, elle est liée aux protéines ou aux lipides de la membrane) ;
  - les gaines : les gaines contiennent des protéines « lectine-like », capables de se fixer à des motifs glucidiques spécifiques (Higgins et Novak, 1997) ;
  - les polymères capsulaires : polysaccharides liés aux phospholipides de la paroi cellulaire de manière covalente (Robert, 1996).
- Les PEC qui sont faiblement liés aux membranes cellulaires :
  - Ils peuvent être décrits comme les « slimes » : substances visqueuses, muqueuses, qui entourent les cellules

### 1.3.3. Les PEC solubles

Les PEC solubles regroupent des macromolécules solubles et colloïdales (qui pourtant ne sont pas des polymères dissous) et même les « slimes » (Wingender et al., 1999). Les PEC solubles sont donc de faiblement liés à libres, ils évoluent entre ces deux états.

Wingender et al. (1999) ont finalement défini les PEC solubles et liés en fonction du protocole d'extraction : pour les PEC solubles, une extraction peu énergétique suffit (centrifugation, ...) alors que les PEC liés nécessitent des méthodes permettant une dispersion de la biomasse (chauffage, réactif chimique, ...).

### 1.3.4. Composition biochimique et minérale

La teneur en MEC présente dans les biofilms est variable. De même, le taux des différentes molécules des PEC est très hétérogène. Ces paramètres dépendent de la nature du biofilm (boues activées, boues granulaires, biofilms de culture pure de bactéries (Tableau A1), mais aussi de la composition du milieu (Tableau A2). Frolund et al. (1996) ont décrit les molécules organiques suivantes dans les PEC : les protéines, les polysaccharides, les substances humiques-like, les acides uroniques et les acides nucléiques. Les composés majeurs des boues activées et granules sont les protéines, les sucres et les substances humiques-like alors que les sucres (polysaccharides et acides uroniques) sont majoritaires pour des cultures de souche pure.

Tableau A.1 : Exemples de concentrations en protéines, polysaccharides, substances humiques-like, acides uroniques, lipides et acides nucléiques de solutions de PEC extraits à partir de différentes biomasses.

Biomasse	Technique d'extraction	Prot.	Polysac.	Subst. hum.	Ac. uron.	Lip.	Ac. nucl.	Unités /g boue	Références
Boue granulaire anaérobie	Résine	11	8	6	1	/	0,1	mg.g <sup>-1</sup> MVS	Liu et Fang, 2002b
Boue granulaire anaérobie	Chauffage	110	25	/	/	/	45	mg.g <sup>-1</sup> MVS	Puñal et al., 2003
Boue granulaire anaérobie	Résine	10	7	11	1	/	1	mg.g <sup>-1</sup> MES	D'Abzac et al., 2010a
Boue activée	Résine	30	13	11	5	< 2,1	3	mg.g <sup>-1</sup> MES	Comte et al., 2006
Boue activée	Résine	243	48	126	6	/	/	mg.g <sup>-1</sup> MVS	Frolund et al., 1996
Biofilm d'égout	Résine	154	12	293	6	/	12	mg.g <sup>-1</sup> COT	Jahn et Nielsen, 1995
Culture de <i>Klebsiella aerogenes</i>	Centrifugation	54	89	/	27	/	9	mg.g <sup>-1</sup> MES	Brown et Lester, 1980

L'étude de la fraction minérale est très peu documentée dans la littérature. La teneur en matière minérale dépend du type de biofilm (granule > boues activée) (Tableau A3) mais aussi de la nature du substrat. Ainsi, un substrat riche en matière minérale (vinasse de cognac incluant les traces de traitement des vignes à la bouillie bordelaise) induit une teneur élevée en matière minérale dont des quantités importantes de Cu dans la MEC (Tableau A3).

Tableau A.2 : Exemples de concentrations en protéines, polysaccharides et acides nucléiques de solutions de PEC extraits à partir de boues activées traitant différents effluents (Sponza, 2002).

Types d'effluents traités	Prot. (mg.g <sup>-1</sup> MVS)	Polysac. (mg.g <sup>-1</sup> MVS)	Acides nuc. (mg.g <sup>-1</sup> MVS)
Industrie chimique	48	17	10
Industrie du cuir	47	27	12
Industrie de la teinture	42	26	13
Industrie du vin	70	17	6
Station d'épuration municipale	71	17	7

Tableau A.3 : Fraction minérale de la MEC extraits par résine à partir de différentes biomasses et de différents effluents.

Types d'effluents traités	Biomasse	Fraction minérale % (extraction par la résine) (mg MM/ mg MS)	Références
Station d'épuration municipale	Boues activées	28	Conte et al., 2006
Vinasse de Cognac	Boue floculante anaérobie	75	D'Abzac et al., 2010b
Papeterie	Boues granulaire anaérobie	52	D'Abzac et al., 2010b
Distillerie (éthanol)	Boues granulaire anaérobie	65	D'Abzac et al., 2010b

#### 1.3.4.1. Fraction organique

##### ❖ Sucres : polysaccharides et acides uroniques

Dans les cultures de souche pure, les polysaccharides sont souvent les composés majeurs de la MEC (Costerton et al., 1995), alors que d'autres supports moléculaires (protéines) sont présents pour les biofilms complexes. Les sucres sont le plus souvent hydrophiles grâce aux liaisons hydrogènes qu'ils établissent entre l'eau et leurs groupements hydroxyles. Les polymères, dont les unités sont liées en  $\alpha$  (1-4) sont plus facilement biodégradables que les

unités liées en  $\beta$  (1-4). Les liaisons en  $\beta$  (1-4) ont plutôt un rôle structurel dans le vivant. La biosynthèse des sucres est intra ou extracellulaire (Kumar et al., 2007).

La plupart des microorganismes sécrètent des polysaccharides. Ils sont composés majoritairement de sucres neutres (glucose, galactose, mannose) (Dignac et al., 1998). Certains sucres sont substitués par des groupes variables : hydroxyle, acyles, acétylé, phosphate. Les polysaccharides des archées et des algues possèdent des groupements sulfates (Sutherland, 2001b). Les exopolysaccharides entrent dans la composition *i*) de la membrane cellulaire des bactéries Gram négatif (lipopolysaccharides), *ii*) des capsules liées de façon covalente à la membrane cellulaire, *iii*) des « slimes » faiblement liés aux cellules (Kumar et al., 2007) (Figure A2(A)). Les acides uroniques sont des sucres dont le groupe en C<sub>6</sub> a été oxydé en acide carboxylique. Les acides uroniques issus de la MEC de floccs confèrent aux sucres des fonctions ionisables (Sutherland, 2001b) et sont plus hydrophiles que les polysaccharides. Ils ne représentent que 1 à 2 % de la masse des PEC (Frolund et al., 1996 ; Bura et al., 1998).

Certains sucres ont la capacité de former des gels en présence d'ions Ca exclusivement (et non d'ions Mg). Ils forment une structure en « boîte à œufs » (Christensen et al., 1990) (Figure A2(B)). Dans cette structure les ions Ca créent des liaisons faibles avec les motifs d'acides uroniques des exopolysaccharides. Ainsi, Lin et al., (2010) ont isolé des PEC issus de boue granulaire aérobie, des « exopolysaccharides alginate-like » (« ALE »). La structure ALE forme un hydrogel en présence de CaCl<sub>2</sub>. Sa capacité à former un gel dépend de la présence d'acide mannuronique et guluronique. L'alginate permet aussi de retenir l'eau dans les biofilms (Chang et al., 2007). D'ailleurs les sucres fortement liés aux cellules sont très hydratés. Les sucres faiblement liés aux cellules n'ont pas forcément cette capacité à lier l'eau (Chang et al., 2007).

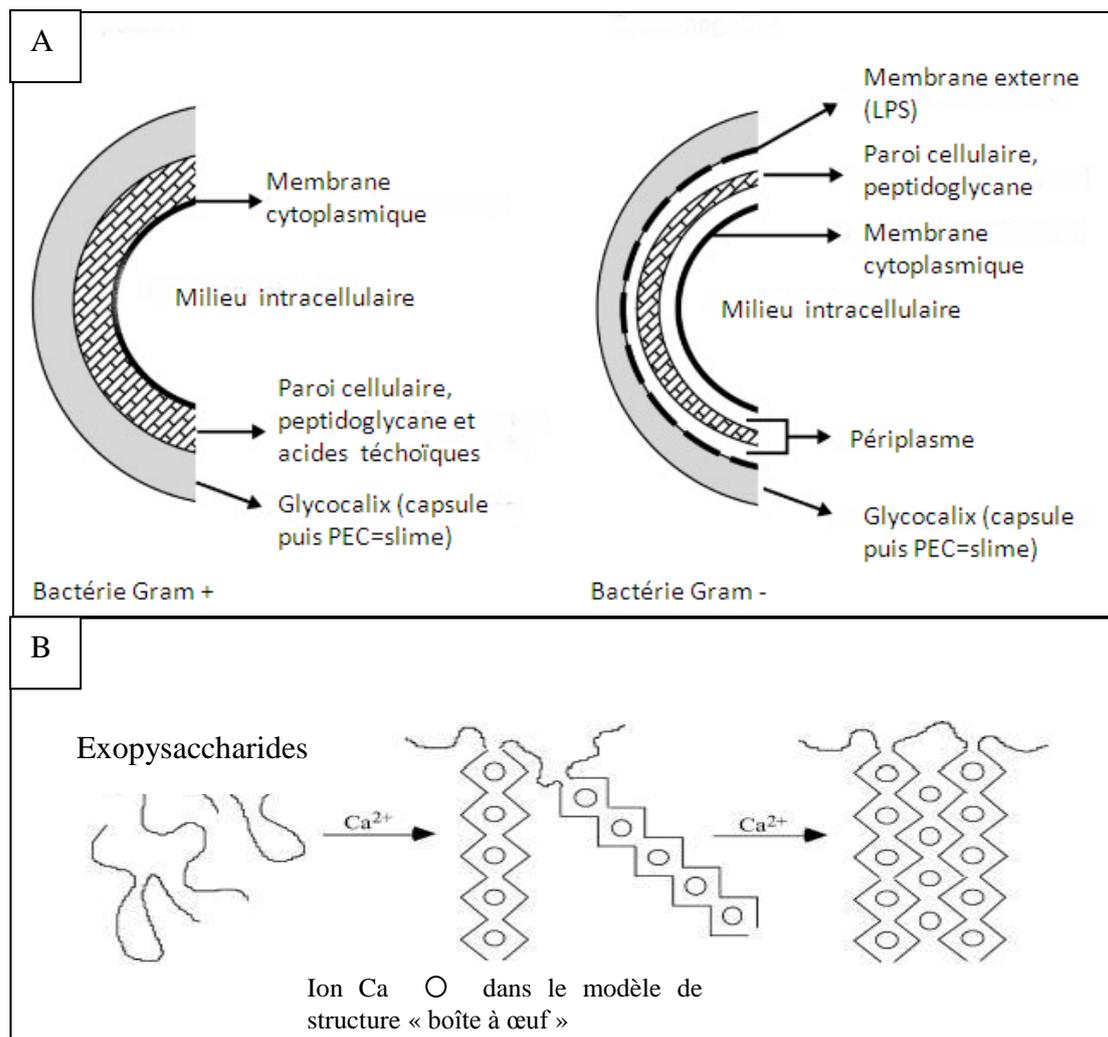


Figure A.2 : Les carbohydrates de la MEC

- (A) Localisation des polysaccharides extracellulaires de la paroi bacterienne produits par les bactéries Gram+ et Gram- (Ruas-Madiedo et de los Reyes-Gavilán, 2005).  
 (B) Formation d'un gel d'alginate en présence d'ions Ca (Sobeck et Higgins, 2002).

❖ Protéines

Les protéines sont les composés majoritaires des PEC issus des biomasses épuratoires (Azeredo et al, 1999 ; Liu et Fang, 2002b ; Comte et al., 2006 ; D'Abzac et al., 2010a). Les protéines sont un enchaînement d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. La chaîne latérale des acides aminés présente différents groupements (amine, carboxylique, alcool, thiol) et propriétés (chargé, polaire, apolaire), conférant aux protéines un large potentiel d'interaction (ionique, hydrogène, hydrophobe) avec d'autres molécules (Mayer et al., 1999).

La majorité des protéines ont une origine intracellulaire (pas de synthèse extracellulaire). Les exoprotéines sont sécrétées via des mécanismes spécifiques à chaque bactérie (Binet et al., 1997). Les protéines peuvent être associées à des sucres ou des lipides, ces structures sont respectivement nommées « glycoprotéines » et « lipoprotéines ». La présence de glycoprotéine est suspectée (Jorand et al., 1998) dans la MEC des biomasses épuratoires mais pas encore réellement prouvée. Görner et al. (2003) ont montré l'existence d'une association forte entre protéine et sucre dans la MEC issue de boues activées par chromatographie CES/infrarouge. Park et Novak, (2009) ont montré que seules les glycoprotéines étaient capables d'inhiber un test d'hémagglutination entre les globules rouges et les lectines de la MEC de boues activées. Les lectines étaient donc en interaction avec les glycoprotéines de la MEC. Les lectines sont des protéines qui reconnaissent et fixent un sucre spécifique. Ce sucre peut être libre ou appartenir à une glycoprotéine.

Les protéines de la MEC ont des fonctions variées dans les biofilms. Les enzymes sont des protéines qui ont des fonctions métaboliques : certaines hydrolysent les substrats polymériques de haut poids moléculaire (Frølund et al., 1996). Les protéines possédant une activité « lectines » ont une capacité d'adhésion : une protéine « lectine-like » a été décrite par Higgins et Novak, (1997) dans la MEC issue de boues activées. Des protéines bêta amyloïdes, connues pour leur capacité d'agrégation ont été mises en évidence par Otzen et Nielsen (2008). Les enzymes sont liées aux cellules par des liaisons hydrophobes (Gessesse et al., 2003) ou sont piégées dans la MEC (Cadoret et al., 2002). Selon Frølund et al. (1996), elles se situeraient dans la partie faiblement liée de la MEC des boues activées.

#### ❖ Substance humique-like

Les substances humiques proviennent du sol. Pour la MEC, les composés ne proviennent pas du sol, les auteurs nomment ainsi ces composés en « substance humique-like ». Ces molécules sont très hétérogènes. Elles sont issues des dégradations biologiques ou chimiques de résidus organiques de l'environnement et ayant subi une repolymérisation (Franciesco et al., 2002). Leurs principaux composants sont les phénols, les sucres et les acides aminés (Wuertz et al., 2003). De nombreux groupes fonctionnels sont ainsi présents dans la structure (alcool, phénol, énols, carboxylique, quinones, lactones). Dans la MEC, les substances humiques-like sont issues d'une adsorption ou d'une dégradation des polymères par les microorganismes.

❖ Acide nucléique

L'ARN et l'ADN sont deux polymères composés d'un enchaînement de nucléotides. Les nucléotides sont composés d'un sucre, un groupe phosphate et une base azotée purique ou pyrimidique. L'ADN est bicaténaire et possède une structure hélicoïdale où les bases azotées sont tournées vers l'intérieur de l'hélice. L'ADN extracellulaire hélicoïdal est linéaire ou circulaire (Steinberger et Holden 2005). Les sucres (ribose ou désoxyribose) et les phosphates sont des sites d'interaction potentiels avec d'autres molécules. Les auteurs ont d'abord considéré la présence d'acide nucléique comme un indicateur de la lyse cellulaire. Toutefois certains microorganismes peuvent sécréter des teneurs en ADN jusqu'à 50% plus abondantes que l'ADN intracellulaire (Steinberger et Holden 2005). L'ADN des PEC provient de la lyse des cellules mais également d'une excrétion (Böckelmann et al. 2006). En travaillant sur la MEC de boue granulaire, Cheng et al. (2011) ont mis en évidence de l'ADNe (extracellulaire) dont l'empreinte électrophorétique DGGE et l'analyse génomique montrent une différence avec l'ADN intracellulaire. Ainsi les auteurs avancent un rôle structurel de l'ADN dans la MEC, confirmé par Böckelmann et al. (2006). L'ADN, support moléculaire de l'information génétique, est aussi impliqué dans les échanges d'informations génétiques dans les biofilms (Allesen-Holm et al., 2006).

❖ Lipides

Les lipides regroupent plusieurs classes de molécules telles que *i*) les acides gras, *ii*) les phospholipides (glycérol lié à deux acides gras et à un phosphate), *iii*) les glycolipides (Conrad et al., 2003) et *iiii*) un peu plus complexe, les LPS (lipopolysaccharides). Les lipides sont des molécules possédant une part majeure hydrophobe, ils possèdent quelques groupements fonctionnels (alcool, amine, phosphate, carboxyle). Les lipides représentent une faible part des biomasses épuratoires (1 à 2%) (Dignac et al., 1998). Ils se trouvent dans les couches externes des biomasses granulaires (Sand et Gehrke, 2006). L'origine des lipides est multiple. Ils proviennent *i*) d'une sorption des lipides présents dans le milieu, *ii*) du milieu intracellulaires ou membranaires après une lyse cellulaire, *iii*) ou bien d'une sécrétion issue du métabolisme microbien (Conrad et al., 2003). Des observations microscopiques ont permis de montrer que dans un bioréacteur l'augmentation du temps de rétention des boues induisait une augmentation de l'accumulation de lipides (Liss et al., 2002).

### **1.3.4.2. Fraction minérale**

Les composés minéraux (cations, anions) jouent un rôle important dans le fonctionnement du métabolisme microbien. Les PEC produits par le biofilm fixent des oligoéléments utiles (Nickel, Cobalt par exemple) aux microorganismes.

La fraction minérale des biomasses épuratoires est faiblement documentée ; cette fraction, contrairement à la fraction organique, n'a pas, pour l'instant suscité d'intérêt. La fraction organique a, par contre, un impact démontré dans les bioprocédés de traitement des eaux. La fraction minérale est néanmoins mise en cause quand à la sorption d'éléments métalliques traces par la MEC. Comte et al. (2008) et Guibaud et al. (2009) suspectent la fraction minérale d'intervenir dans la complexation du plomb et du cadmium dans la MEC issue de boue activée. Dans les biofilms impliqués dans le traitement des eaux usées, la fraction minérale se présente sous différentes formes : ionisée (Higgins et Novak, 1997) ou particulaire (Leppard et al., 2003). La forme minérale particulaire solide est formée par des précipités (Juang et al., 2010), et peut atteindre un diamètre supérieur à 2  $\mu\text{m}$  (D'Abzac et al., 2010b).

#### ❖ Cations

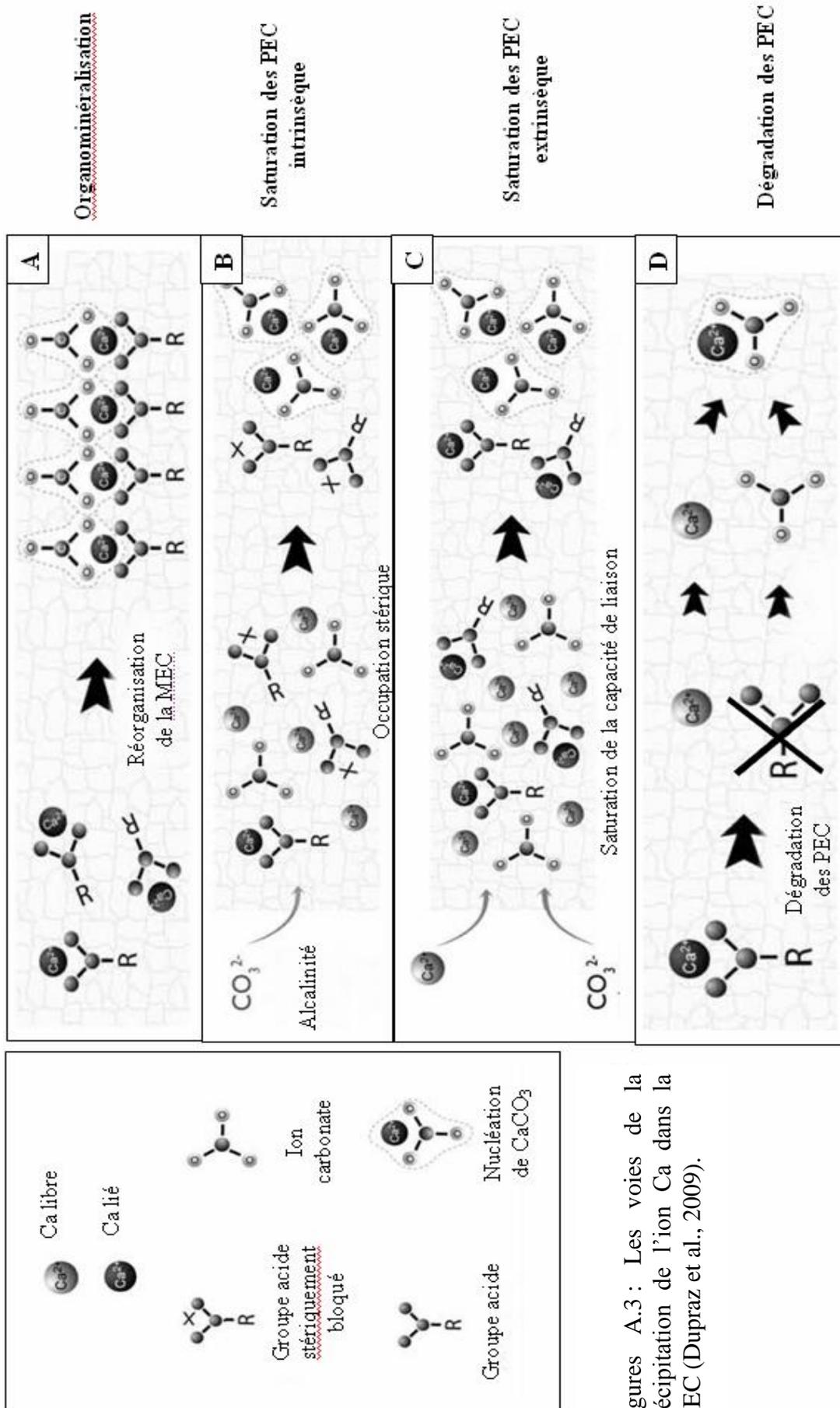
Les cations multivalents (Mg, Ca, Fe) créent des interactions ioniques avec les fonctions ionisées de la MEC (Higgins et Novak, 1997; Sutherland, 2001a). Braissant et al. (2007) montrent que les PEC issus d'une culture de cyanobactéries ou de bactéries sulfatoréductrices ont des capacités de fixation du Ca qui sont respectivement de 183 mg (Ortega-Morales et al., 2006) et 130 mg (Braissant et al., 2007) de Ca/ g PEC. L'addition d'ions Na induit la détérioration du floc des boues activées (Higgins and Novak, 1997), ce qui est attribué aux déplacements des cations divalents par les cations monovalents. Cette expérience montre aussi que les cations de la matrice sont mobiles et interchangeables. De plus, dans les boues activées, la présence anormale de bactéries anaérobies générant des sulfures, induit une défloculation (Wilén et al., 2000). Les auteurs expliquent que l'ion Fe, mobilisé dans la formation d'un précipité de FeS, n'est plus disponible pour les interactions ioniques avec les PEC.

❖ Particules minérales solides

Au niveau des boues granulaires, un excès de Ca induit une précipitation de  $\text{CaCO}_3$  (Figure A3<sub>C</sub>) qui se fait dans la structure intra granulaire (Yu et al., 2001). Tiwari et al. (2006) précisent que ces précipités peuvent consolider la structure dans les cas de granules avec une faible activité méthanogénique. Un excès de Fe induit de même, dans les granules, la formation d'un précipité de FeS (Yu et al., 2000). Juang et al. (2010) montrent une forte teneur de fraction minérale précipitée au centre du granule aérobie. Cette fraction minérale est composée majoritairement par des sels de Ca (dont l'hydroxyapatite :  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) et des sels de Fe (dont l'oxyhydroxyde ferreux :  $\text{FeO}(\text{OH})$ , la strengite :  $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Les auteurs mettent en avant que le centre du granule, plus alcalin (à cause des bactéries dénitrifiantes) favorise la précipitation de Ca et de Fe (Figure A3<sub>B</sub>). Il est aussi envisageable qu'au centre du granule la diminution de la quantité de PEC (Figure A9 a, b, c, f), associée à une augmentation de pH, induise une libération des ions Ca et Fe qui étaient mobilisés par les PEC initialement présents au centre du granule ; les ions, en excès, précipitent (Figure A3<sub>D</sub>). Le précipité initial peut, par ailleurs, être un site de nucléation ou de sorption et ainsi être à l'origine d'une augmentation de la taille des particules minérales (Couillard et Mercier, 1992 ; Guibaud et al., 2009). D'autres éléments minéraux sont présents dans les particules solides, c'est le cas du Si, trouvé dans les PEC issus de granules anaérobies (D'Abzac et al., 2010b). Il est par ailleurs possible que certaines particules minérales soient issues d'un processus d'organominéralisation : Bura et al. (1998) identifient dans les fibres de la matrice des floccs, des particules contenant les éléments Fe, P et S. (Figure A3<sub>A</sub>).

L'ensemble des mécanismes décrits dans ce paragraphe peuvent s'appuyer sur la revue de Dupraz et al. (2009), qui étudie les processus de précipitation du carbonate au sein de matrice de biofilm (Figure A3).

Enfin, la présence d'un centre granulaire riche en substances minérales serait impliquée dans la longévité du granule (Juang et al., 2010). Chan et al. (2004) pensent que la production de PEC améliore le métabolisme énergétique en favorisant la présence et la disponibilité des précipités d'oxyhydroxyde de Fe pour les bactéries.



Figures A.3 : Les voies de la précipitation de l'ion Ca dans la MEC (Dupraz et al., 2009).

## 1.4. Poids moléculaire des PEC

Les molécules des PEC ont des formes, taille et poids moléculaires très hétérogènes. Classiquement, la détermination des poids moléculaires est réalisée par Chromatographie d'Exclusion Stérique (CES) sous haute pression (HPLC : High Pressure Liquid Chromatographie). La détection des fractions séparées en fonction de leur masse moléculaire implique des méthodes variées et en constante évolution. La spécificité de la détection vise en effet, à pouvoir identifier les poids moléculaires des différentes classes de molécules ou mieux encore d'identifier les molécules séparées. Classiquement la CES est souvent couplée à une détection par absorption UV ou par réfractométrie (RF), parfois à un détecteur de carbone organique (DOC). Des méthodes de détection découplées existent aussi (spectrométrie Infra Rouge ; spectrofluorimétrie 3 dimensions). Une analyse des méthodes de séparation en fonction de la masse moléculaire est spécifiquement abordée dans cette synthèse bibliographique (voir paragraphe 3.1.3.). D'autres méthodes de séparation existent comme l'électrophorèse (SDS-PAGE), le fractionnement par couplage flux-force (FFF). Le SDS-PAGE permet de séparer les molécules dénaturées et principalement les protéines (Park et al., 2008).

L'analyse CES prend en compte les poids moléculaires, le nombre de fractions qui correspondent à des pics séparés et l'intensité des pics. En général le nombre de pics principaux varient de 4 à 7 dans la littérature (Frølund et Kieding, 1994 ; Garnier et al., 2005 ; Comte et al., 2007 ; Ras et al., 2011 ; Dominguez et al., 2010b). L'analyse SDS-PAGE prend en compte le profil des bandes (multiples) révélées qui correspondent à des masses moléculaires de protéines dénaturées.

Ainsi, la répartition des poids moléculaires des PEC est fonction :

- de l'origine de type de boue : granulaire anaérobie ou boues activées (Simon et al., 2009) ;
- d'un dysfonctionnement du bioréacteur : la présence de bactéries filamenteuses dans les boues activées induit une augmentation du nombre de fractions dans les PEC (Villain et al. 2010) ;
- des conditions environnementales : les antibiotiques appliqués aux boues activées d'un bioréacteur à membrane sont liés à une augmentation du nombre de fractions séparées pour les PEC solubles et à une augmentation leur intensité (Avella et al., 2010a).

Dans la littérature, malgré une hétérogénéité, les données se recoupent en ce qui concerne les masses moléculaires des protéines et des sucres (Tableau A4).

Tableau A.4 : masse moléculaire des différentes classes de molécules présentes dans les PEC

Classe de molécule	Type de boue	Masse moléculaire (kDa)	Méthode	Référence
Sucres	Boues activées	0.5-1	CES/RF	Görner et al., 2003
	Boues activées	< 0,3 et faible taux vers 200	CES/RF	Ni et al., 2009
	Boues activées	<1	CES/UV/DOC	Tsai et al., 2008
Protéines natives	Boues activées	45-670	CES/UV	Görner et al., 2003
	Boues activées	500 kDa - 0,45 µm	Filtre/Dosage colorimétrique	Park et al., 2008
	Biofilm de <i>Sinorhizobium meliloti</i>	100-400	AFFF/UV	Alasonati et Slaveykova, 2011
Protéines dénaturées	Boues activées	15-75	SDS PAGE	Park et al., 2008
	Granules aérobies	31-97	SDS PAGE	Zhang et al., 2006
Substances humiques-like	Granules aérobies	4	CES spectrofluorimétrie découplée	Adav et Lee, 2011

D'après le tableau A4, les protéines natives ont les masses moléculaires (MM) les plus élevées et réparties sur une large gamme. Les sucres ont des MM faibles (en majorité MM<1kDa). Seviour et al. (2010) ont réalisé une analyse par perméation sur gel et microscopie à force atomique découplée sur les PEC issus de granules aérobies. Ces auteurs avancent l'hypothèse de sucre de haut poids moléculaire impliqués dans la formation de gel dans les PEC issus de granules aérobies (100 kDa). Les substances humiques-like ne sont pas décrites dans la littérature, sauf pour la seule étude citée ci-dessus (Tableau A4). Elles auraient une faible MM. Les protéines dénaturées présentent des MM inférieures à 100 kDa, ce qui signifie que ces molécules ont une structure quaternaire multimérique sous forme native ou sont associées à d'autre molécule dans la MEC. Huang et al. (2012), décrivent cependant des protéines dénaturées entre 20 et 250 kDa mais il s'agit de protéines issues du colmatage de la membrane d'un bioréacteur à membrane. Les PEC responsables du colmatage des membranes appartiennent aux PEC solubles (Ni et al., 2011).

Ni et al. (2011) précisent que les PEC solubles ont une MM inférieure à 1 kDa ou supérieure à 10 kDa. Les PEC solubles sont identifiés comme protéines et polysaccharides. Tsai et al. (2008) montrent que la fraction de  $MM > 20$  kDa est plus importante au niveau des PEC solubles (33 %) qu'au niveau des PEC liés (20%). De même, Domingues et al. (2010b) décrivent une majorité de PEC solubles (90%) avec une  $MM > 54$  kDa alors que les PEC faiblement attachés ont des MM plus élevées (jusqu'à 800 kDa). Les PEC fortement attachés présentent un % de molécules de hautes MM plus faible que les PEC faiblement attachés. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Yu et al. (2009) qui montrent que les PEC fortement attachés présentent les MM les plus élevées ( $320 < MM < 1200$  kDa). Ces molécules sont attribuées à la présence de protéines et d'ADN. Anderson et al. (2009) montrent de même que les PEC capsulaires (fortement liés) ont des MM plus élevées que les PEC faiblement liés. Les répartitions des MM en fonction du degré d'attachement aux bactéries restent donc à préciser puisque les résultats de la littérature ne sont pas homogènes.

## **1.5. Origine et production de la MEC**

La MEC a trois origines (Dignal et al., 1998 ; Wingender et al., 1999 ; Flemming et Leis, 2001) :

- la sécrétion active de molécules par les bactéries,
- les produits issus de la lyse cellulaire,
- l'adsorption de composés organiques ou minéraux par l'environnement.

### ***1.5.1. Sécrétion active de molécules par les bactéries***

Les PEC sont produits naturellement par les microorganismes qui vivent en communauté, mais tous les microorganismes ne produisent pas de PEC. Cette capacité est moins développée pour une vie planctonique. Selon Costerton et al. (1987), la production des PEC par les souches pures ne confère aucun avantage sélectif à l'espèce impliquée, alors que dans des situations de compétitivité multi-espèces, la production de PEC est essentielle pour la survie d'une population. Ainsi certaines espèces bactériennes sécrètent des substances qui inhibent le développement d'autres espèces. Adav et al. (2010) ont décrit les comportements de deux espèces concurrentes au sein d'un agrégat. La présence de PEC permet l'absorption des substances inhibitrices sécrétées par une des deux espèces, et permet donc la présence simultanée des deux espèces.

Des mécanismes spécifiques de sécrétion des PEC ont été identifiés chez les bactéries pour les protéines (Binet et al., 1997 ; Gatsos et al., 2008) et pour les polysaccharides (Jonas et Farah., 1998 ; Jefferson et Cerca., 2006). Li et al. (1998), décrivent également la sécrétion active de vésicules composées de molécules périplasmiques (LPS, enzymes, phospholipides) et issues de la membrane. La sécrétion d'ADN permet également l'échange d'informations génétiques entre les bactéries (Lorenz et Walkernagel., 1994). La présence spécifique d'ADNe (extracellulaire), différent de l'ADNi (intracellulaire) a été mis en évidence dans des boues granulaires (Cheng et al., 2011).

Les PEC solubles sont un cas particulier. Ces molécules ont été assimilées aux produits microbiens solubles (SMP) dans le modèle établi par Laspidou et Rittman (2002). Les SMP sont constitués par les produits associés à la biomasse (BAP) et par les composés associés à l'utilisation du substrat (UAP).

- ❖ BAP. Les produits microbiens solubles ou PEC solubles, sont relargués soit par dissolution soit par hydrolyse, à partir des fractions de PEC liés, vers la phase liquide (Hsieh et al., 1994). Cette fraction de SMP constitue les produits associés à la biomasse (BAP). Ces substances peuvent être utilisées comme nutriment (Barker et Stucley, 1999).
- ❖ UAP. L'ensemble des composés solubles issus de la dégradation des substrats par le métabolisme des microorganismes constitue les composés associés à l'utilisation du substrat (UAP). L'utilisation des substrats par les microorganismes, induit donc une augmentation des produits liés à son utilisation (UAP).

Ni et al. (2011) précisent que les PEC solubles de faible poids moléculaire correspondent aux UAP ( $MM < 1kDa$ ) alors que les BAP sont de haut poids moléculaire ( $MM > 10kDa$ ). Les SMP sont constitués de protéines et polysaccharides.

### ***1.5.2. Facteurs influençant la sécrétion de molécules par les bactéries***

La MEC joue donc un rôle tampon dans la nutrition ou la protection pour les microorganismes de la matrice. Diverses études ont décrit les PEC solubles comme des composés facilement métabolisables, source de carbone et d'énergie pour les microorganismes (Laspidou et Rittmann, 2002). Des études menées sur la résistance aux antibiotiques montrent qu'une

bactérie vivant dans un biofilm résiste de 10 à 1000 fois plus que dans une vie planctonique (Prosser et al., 1987). Les paramètres environnementaux susceptibles d'influencer la sécrétion de molécules par les microorganismes sont présentés ci-dessous.

#### **1.5.2.1. Etat physiologique de la bactérie**

La production de certains types de PEC est liée à l'état physiologique de la bactérie. Les PEC capsulaires sont préférentiellement produits pendant la phase exponentielle de croissance alors que les PEC faiblement liés (extérieur à la capsule) sont produits pendant la phase stationnaire (Decho et Lopez, 1993). En général, la synthèse de PEC est maximale en phase stationnaire (Bhaskar et Bhosle, 2005).

#### **1.5.2.2. Facteurs de stress**

Les facteurs de stress stimulent la synthèse de PEC : teneur faible en substrat (Hoa et al., 2003), salinité (Mishra et al., 2008), présence d'éléments métalliques (Mikes et al., 2005). Puñal et al., (2000) montrent que la limitation en azote favorise la production de PEC au cours de la granulation anaérobie. Les faibles teneurs en substrat favorisent en particulier l'augmentation des PEC solubles (Aquino et Stuckey, 2003). Diverses études ont observé l'augmentation de la production de PEC en présence de composés toxiques (Kuo et Parkin, 1996 ; Joshi et Juwarkar, 2009). Avella et al. (2010a) ont travaillé sur des boues activées d'un bioréacteur à membrane et décrivent une augmentation de PEC solubles. Leur taux de protéines augmente particulièrement en présence d'un antibiotique. Kazy et al. (2002) ont mis en évidence que les souches résistantes produisent de plus fortes quantités de polysaccharides qui ont des propriétés complexantes avec les éléments métalliques. De même, l'augmentation de la proportion en polysaccharides et de la quantité de PEC est aussi décrite par Zhang et al. (2010). Ces auteurs ont étudié la fraction faiblement liée au sein d'agrégats issus de réacteur dénitrifiant lors d'une augmentation de la concentration en NaCl. Peu de chercheurs étudient l'impact d'un facteur de stress sur la fraction minérale des biomasses épuratoires. Néanmoins, Julien (2011) montre que la chloration d'un biofilm sur tuyaux induit une diminution de la teneur en matière organique de la MEC et une augmentation de la teneur de la fraction minérale. Ainsi, il est observé une augmentation des carbonates, oxydes et une augmentation du Ca et du Mg.

### **1.5.2.3. Caractéristiques du substrat**

Arabi et al. (2008) ont montré qu'une augmentation des ratio « azote/carbone » en concentration massique de caséine/amidon (de 2 à 8) induit une augmentation de la production de PEC liés et solubles pour les boues activées issues d'un bioréacteur à membrane. Cet effet est plus nuancé pour l'étude de Ye et al. (2011) puisque l'augmentation du ratio azote/carbone en concentration massique d'urée/amidon (de 0,1 à 0,25) n'induit qu'une augmentation des PEC faiblement liés. Cependant, l'impact de l'« azote » qui semble augmenter la production des PEC ne s'applique pas forcément à d'autres études. Ainsi, Hoa et al. (2003) ont décrit l'influence du taux de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  d'une eau synthétique glucosée sur la production de PEC issus de boues activées. La production de PEC varie du simple au double, pour un ratio qui passe de (15: 2) à (3: 2) pour les composés ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ :  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) et des concentrations en glucose stables. Par ailleurs, la production de PEC triple pour le ratio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ :  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) de (3: 5).

### **1.5.2.4. Conditions physiques**

Le taux de cisaillement des réacteurs influence la composition des PEC. Ainsi l'augmentation du taux de cisaillement ou d'aération dans un SBR (Sequencing Batch Reactor) augmente la quantité de PEC des boues (Adav et al., 2008a). Le taux de sucre augmente dans les PEC issues de boues activées lorsque le débit d'air augmente alors que le taux de protéine reste stable (Shin et al., 2001). Le taux de PEC solubles augmente par relargage des agrégats lorsque les boues sont soumises à des forces hydrodynamiques et de cisaillements pour des périodes de rétention non prolongées (Aquino et Stuckey, 2006 ; Sheng et al., 2006a). Par ailleurs, Nielsen et al. (1998) montrent une diminution du taux de PEC issus de boue pour des conditions anaérobies.

Ainsi lors de nouvelles conditions environnementales (physico-chimiques), la variation du métabolisme bactérien, la sélection de certaines bactéries (Liu et Fang, 2002b) induit une variation de la teneur en PEC. Les études n'ont toujours pas permis de montrer si les PEC étaient sécrétés avant ou après l'agrégation des microorganismes (Liu et al., 2004b).

D'autre part, d'autres composés se retrouvent piégés dans les PEC sécrétés par les bactéries : les produits intracellulaires (Wingender et al., 1999) issus de la lyse des cellules ainsi que les composés issus de l'environnement (effluent).

### ***1.5.3. Composés piégés dans la MEC***

Lors de la lyse cellulaire, les molécules intracellulaires (protéines, acides nucléiques) et les molécules constituant les parois cellulaires (peptidoglycane, phospholipides, LPS) sont relarguées et piégées dans la MEC. Les produits microbiens solubles (PMS) ont aussi été définis comme des composés cellulaires solubles (Tsai et al., 2008) *i*) relargués lors de la lyse cellulaire ou *ii*) diffusant à travers la membrane cytoplasmique. ou *iii*) issus d'une perte lors de la division cellulaire.

Les PEC forment un réseau polymérique constitué de pores. Ce réseau possède une grande surface de contact capable d'adsorber des polluants, des nutriments et des minéraux (Liu et al., 2001).

Les effluents d'eaux usées contiennent des composés organiques et minéraux (toxiques ou non) qui peuvent être adsorbés sur la matrice ou les bactéries elles-mêmes (Wingender et al., 1999). Cependant la MEC est un piège filtrant : certains éléments seront neutralisés (antibiotiques, éléments métalliques), d'autres modifiés et/ou hydrolysés et métabolisés (substance humique-like, polymère hydrolysé, substrat métabolisé (UAP)), d'autres utilisés comme constituant de la matrice (eau).

#### **1.5.3.1. Composés exogènes constitutifs de la MEC**

L'eau est le substrat majeur des réactions biochimiques. L'eau intracellulaire a pour origine l'eau extracellulaire. L'eau se trouve principalement dans la MEC dans les boues activées (Kieding et al., 2001). Elle est liée aux PEC par interaction ou piégée dans le réseau poreux des PEC (Liss et al., 1996). L'hydratation des biomasses est liée à la présence de protéines et de polysaccharides dans la MEC (Jin et al., 2004). Les polysaccharides semblent très impliqués dans la rétention d'eau :

- Kumar et al. (2007), ont décrit une couche de polysaccharides fortement hydratée autour des cellules ;
- Roberson et Firestone (1992) montrent qu'en réponse à une dessiccation, les bactéries produisent des polysaccharides ;
- Cheng et al. (2007b) montrent que l'alginate permet de retenir l'eau dans une couche extracellulaire proche de la membrane des bactéries afin de ralentir sa déshydratation.

Les substances humiques-like sont des produits de dégradation biologique ou chimique de résidus organiques de l'environnement et ayant subi une repolymérisation (Francioso et al., 2002). Ces substances peuvent être adsorbées sur la MEC. L'étude de Liu et al., (2011) montre que les substances humiques-like ne sont dégradées qu'en partie par les boues activées d'un bioréacteur à membrane. Les PEC liés contiennent néanmoins des substances humiques-like dont la structure ou composition est différente des substances humiques-like de l'effluent.

## **1.6. De la nature de la MEC à l'architecture du biofilm**

Une modification de la MEC est liée à un changement des conditions environnementales. Les changements des conditions du milieu favorisent la forme du biofilm. Ainsi, un milieu riche en glucose peut favoriser le développement de certaines bactéries filamenteuses aérobies telles que *Sphaerotilus natans* (Kämpfer et al., 1995) conférant au floc une structure poreuse et hétérogène (Wilén et Balmer, 1999). A l'inverse, un milieu riche en acétate est propice au développement de colonies de bactéries non filamenteuses (*Aeromonas jandaei*, *Bacillus*) conduisant à des floccs avec un aspect granulaire (Li et Yang, 2007). Une variation des espèces bactériennes a été décrite lors de la granulation (Etchebehere et al., 2003 ; Yi et al., 2003). Le lien entre la forme du biofilm et les conditions environnementales peut être direct ou indirect. Ainsi la réponse des espèces bactériennes aux modifications des conditions physico-chimiques se traduit par la variation des PEC produits. La modification du milieu provoque aussi une variation des espèces de microorganismes, induisant alors, indirectement, une variation des PEC produits (Sheng et al., 2010).

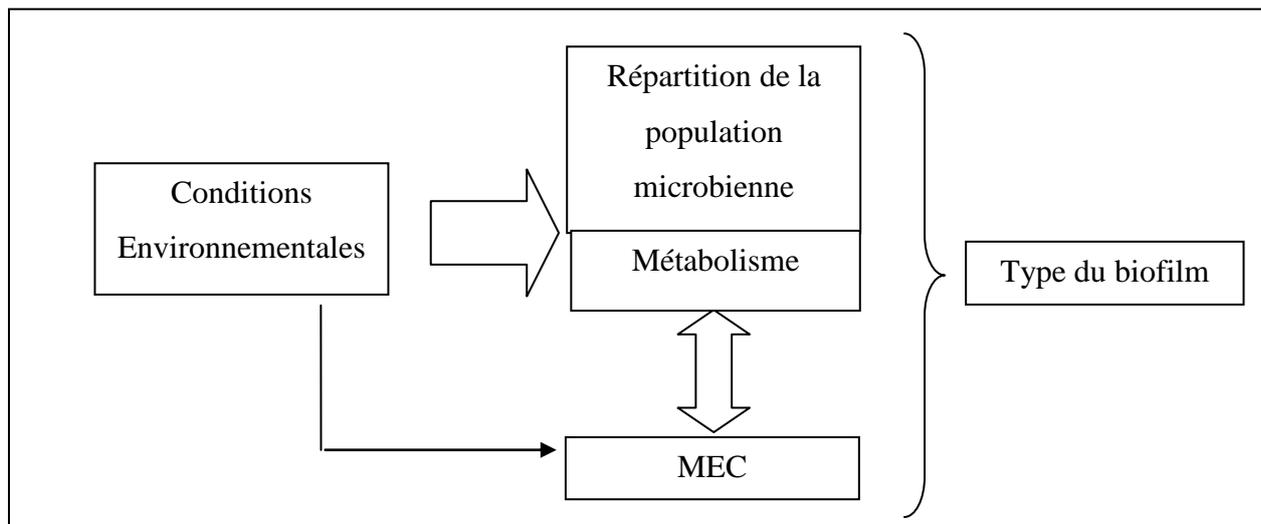


Figure A.3 : Relation entre les acteurs impliqués dans la forme du biofilm.

Par ailleurs, certains auteurs montrent que l'ajout de polymères exogènes permettrait de modifier la répartition des espèces microbiennes, susceptibles d'améliorer les performances du granule. Ainsi, Vivanco et al. (2006) montrent que l'ajout de chitine (polymère dérivé du chitosane) permet de diminuer le nombre de cellules mortes mais aussi d'acquies une répartition bactéries /archées favorable aux archées. La nature de la MEC influence donc directement la répartition des espèces microbiennes. La Figure A4 montre les impacts environnement/microorganismes/MEC dans les agrégats.

## 2. Configuration des différentes formes de biofilms

Les granules sont des agrégats bactériens comparables aux floccs mais de structure plus homogène, arrondie et compacte, ils sont plus résistants et peuvent être séparés des floccs par tamisage. La vitesse de décantation des granules (60 m/h ; Liu et al., 2003) est beaucoup plus élevée que celle des floccs (8 m/h ; Quin et al., 2004). Le taux de PEC plus élevé dans les granules que dans les floccs ou biofilm (Tay et al., 2001) pourrait justifier l'augmentation de la compacité de la structure. Par ailleurs, les granules ont une charge globale moins négative (Morgan et al., 1990) et sont deux fois plus hydrophobes (Liu et al., 2004a) que les floccs. La flocculation et la granulation sont des phénomènes d'autoagrégation.

L'observation microscopique d'agrégats spécifiquement marqués ainsi que des conclusions d'expériences permettent d'émettre des hypothèses sur l'organisation des agrégats sous forme de floc ou de granule, et en particulier de spécifier la place de la MEC dans l'agrégat.

## 2.1. Les agrégats issus de biofilm sous forme de microcolonies

Lawrence et al. (2007) ont observé des microcolonies issues de biofilm d'eau de rivière. Ils montrent que les bactéries détectées sont uniformément réparties avec une tendance à ne pas occuper la couche externe du biofilm (Figure A5). La répartition de molécules spécifiques des PEC comme les glycoprotéines et le fucose, le N-actétylgalactosamine, semble être la résultante, selon les auteurs, d'un enrobage complexe des polymères autour des bactéries. Dans cet exemple, les sucres semblent se situer à l'extérieur de microdomaines, alors que les glycoprotéines seraient surtout à l'intérieur (Figure A6).

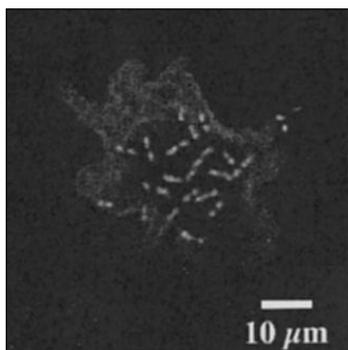


Figure A.4 Observation en microscopie confocale d'une microcolonie bactérienne de biofilm issu d'une eau de rivière (Lawrence et al., 2007). Mise en évidence des  $\alpha$ Proteobacteria (hybridation avec ALF1b).

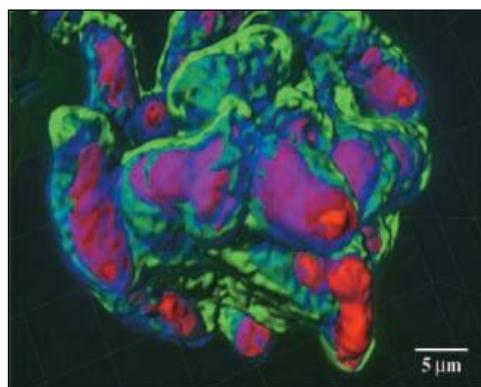


Figure A.5 : Observation en microscopie confocale d'une microcolonie bactérienne de biofilm issu d'une eau de rivière (Lawrence et al., 2007). En rouge, marquage des glycoprotéines par la lectine *Cicer ariatinum* conjuguée à du Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate (TRITC), en bleu, marquage du fucose 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 de la Fluoréscéine IsothioCyanate 5(FITC).

## **2.2. Les agrégats issus de boues activées sous forme de floc**

Li et Ganczarczyk (1990) ont montré par analyse de différentes coupes de floccs, que la distribution des cellules et de la MEC est complexe laissant un grand nombre de canaux libres pour l'eau.

Le sonication (30 secondes) appliquée à des floccs de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre désorganise le floc en micro-floc de 2,5, 13,51 et 125  $\mu\text{m}$  de diamètre avec libération de PEC (protéines majoritairement). Cette étude a permis à Jorand et al. (1995) d'établir le modèle présenté sur la Figure A7<sub>A</sub>. Dans ce modèle la formation du floc s'organise de manière séquentielle et discontinue. Ainsi des particules de 2,5  $\mu\text{m}$  s'agrègent en microcolonie de 13  $\mu\text{m}$  de diamètre, puis intervient un second assemblage où les microcolonies forment des floccs de 51 et 125  $\mu\text{m}$  de diamètre. Il en résulte un agrégat formé par de multiples microdomaines comme ceux décrits dans les microcolonies issues de biofilm d'eau de rivière (Figures A5 et A6).

Sheng et al. (2006a) ont appliqué une contrainte hydrodynamique prolongée et mettent en évidence une augmentation de la dispersion de la boue (augmentation de la turbidité du surnageant). Parallèlement, des quantités croissantes de PEC sont libérées jusqu'à se stabiliser. Ils concluent qu'il existe une « fraction dispersable » des floccs, représentant environ 18 % de la masse des boues. En augmentant l'intensité de la contrainte (pH 11), une deuxième fraction se dissocie. Le modèle du floc consiste donc en une organisation multi-couches où la couche la plus externe est la plus dispersable, la région interne est plus stable. (Figure A7<sub>B</sub>).

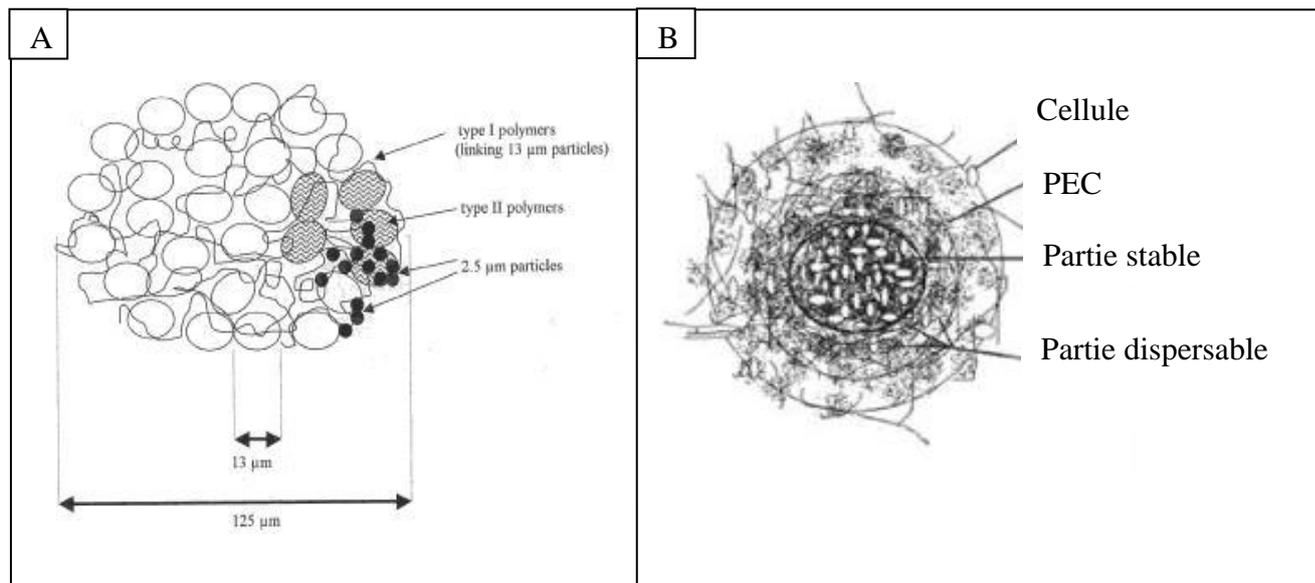


Figure A.6 : Modèle de la structure des flocons dans les boues activées selon Jorand et al., 1995 (A) et selon Sheng et al., 2006a (B).

### 2.3. Les agrégats issus de boue granulaire sous forme de granule

Les granules aérobies et anaérobies sont organisés en strate, et pour l'activité biologique, et pour la répartition de la MEC.

Abreu et Alves (2007) sont parvenus à régénérer des boues granulaires anaérobies dont l'activité méthanogène à partir d'acétate était devenue nulle dans un bioréacteur produisant du méthane. L'observation du granule régénéré, par microscopie confocale et marquage cellulaire, montre une structure organisée où l'activité acétotrophique (acidogène/acétogène) est localisée sur une couche externe. Sous cette strate, se situent les bactéries *Methanosaeta* (méthanogènes acétotrophiques). Au centre du granule, des méthanogènes hydrogéntrophiques sont observées (Figure A8). Adav et Lee (2008) confirment une activité cellulaire stratifiée puisque les cellules vivantes sont localisées sur une enveloppe externe (Figure A9D). La formation des biomasses granulaires n'est donc pas l'agrégation aléatoire de microorganismes mais une adaptation évolutive des ces microorganismes (Liu et al., 2006b).

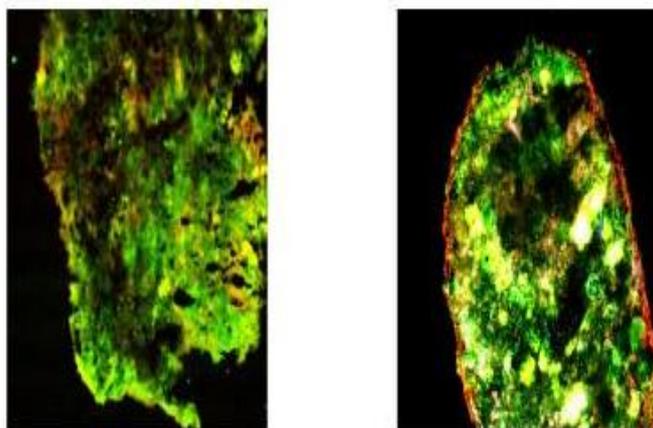


Figure A.7 : Image de granule marqué et observé au microscope confocal à balayage laser (Abreu et Alves, 2007).

Rouge : activité acidogène/acétogène ; Jaune : *Methanosaeta* ; Bleu : Méthanogènes hydrogénotrophique ; Vert : faible hybridation. Granule endommagé (gauche) ; Granule régénéré (Droite).

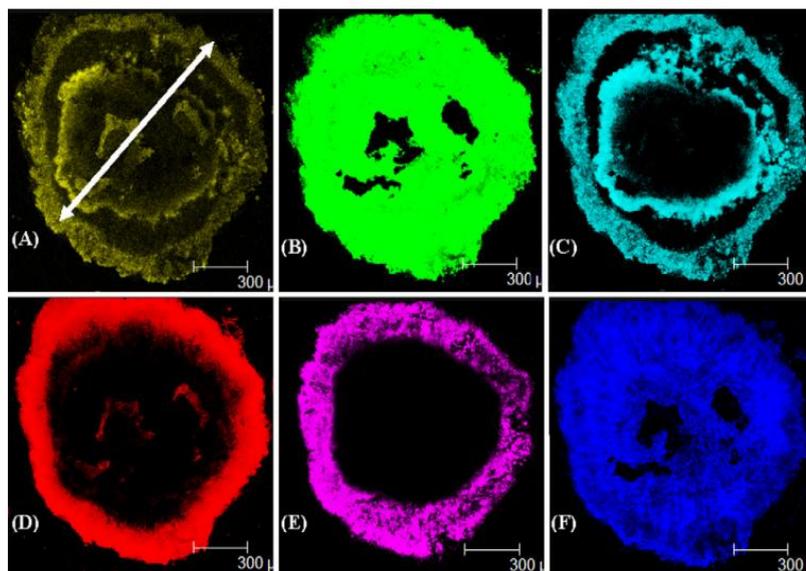


Figure A.8 : Image d'un granule aérobie marqué et observé en microscopie confocale à balayage laser (Adav et Lee, 2008).

(A) lipides (jaune): rouge de Nil; (B) protéines (vert): FITC; (C)  $\alpha$  -polysaccharide (bleu clair): Con A rhodamine; (D) cellules vivantes (rouge): SYTO 63; (E) cellules mortes (violet): Sytox blue; (F)  $\beta$  - polysaccharide (bleu): blanc de calcofluor.

La MEC présente aussi une stratification. Ainsi les protéines de la MEC sont réparties dans tout le granule, (peu au centre) alors que certains sucres sont exclusivement sur la couche externe (Figure A9<sub>B</sub> et C). Ces observations sont confirmées par McSwain (2005). Bastone et Keller, (2001) ont montré que les PEC de la couche externe sont plus résistants aux forces de cisaillement que le noyau. Le centre du granule est riche en précipités minéraux (Juang et al., 2010).

Wang et al. (2005) ont montré que les bactéries situées dans les couches internes du granule produisent de plus fortes quantités de PEC solubles, facilement assimilable par les bactéries.

Ces bactéries ont en effet, un accès difficile au substrat exogène. Par ailleurs, ces bactéries produiraient moins de PEC, ce qui se traduit par une diminution du taux de PEC dans le centre du granule (Zhang et Bishop, 2001).

Caudan (2012) a consacré sa thèse à l'étude de granules aérobies. L'action de la savinase (protéase) entraîne un relargage de microparticules et d'ions Ca. L'action de l' $\alpha$ -amylase entraîne un relargage de macroparticules. Ces expériences, combinées à l'observation en microscopie confocale de coupes de granules marqués (protéines, sucres neutres) et soumis à l'action des enzymes, ont conduit l'auteur à proposer un modèle de l'organisation de la MEC dans les granules aérobies (Figure A10). La couche externe est composée de sucre ; sous cette couche, il existe une association complexe en microdomaines où les sucres entourent les protéines.

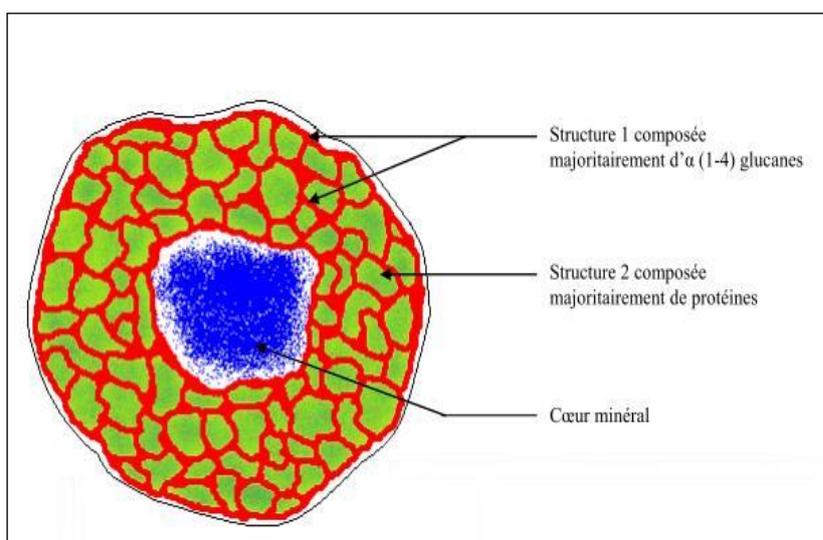


Figure A.9 : Modèle de la structure de granules aérobies selon Caudan (2012).

L'autoagrégation des cellules soumises à différentes conditions physico-chimiques (substrat, force de cisaillements, hydrodynamisme...) impacte la forme du biofilm qui s'organise spécifiquement dans l'espace. Les nouvelles conditions physico-chimiques générées par la conformation de l'agrégat reconditionnent la répartition des activités biologiques qui, à son tour, influence la structure de la MEC. Ainsi lors de la formation des granules, les forces de cisaillements sont susceptibles d'avoir contribué à l'élimination de la MEC dispersable citée pour les floccs (MEC faiblement liée, SMP) et ainsi d'avoir sélectionné les agrégats présentant une couche externe résistante. Dans ces nouvelles conditions, la MEC située à l'intérieur du granule et non soumise aux forces de cisaillements, peut exister sous une forme compacte ou dispersable (SMP).

### **3. Rôle de la MEC dans les agrégats biologiques impliqués dans le traitement des eaux usées**

L'inconvénient majeur des granules anaérobies des réacteurs UASB est la période de latence (2 à 8 mois) avant le démarrage du procédé. Des auteurs ont par ailleurs rapporté la détérioration spontanée des granules sans raison connue (Schmidt et Ahring, 1996 ; Liu et al., 2002 ; Puñal et al., 2003). La stabilisation et l'accélération de la formation des granules sont des thèmes de recherche.

Pour les floccs des boues activées, la stabilité des agrégats est aussi recherchée lors de la séparation solide/liquide (Seka et Verstraete, 2003). D'autres sujets sont à l'étude comme l'amélioration de la décantation et de la déshydratation des boues activées. Enfin pour les bioréacteurs à membrane, l'encrassement des membranes est un problème actuel.

La stabilité est définie comme la capacité des agrégats à résister à des contraintes hydrodynamiques et à des forces de cisaillements (Sheng et al., 2006b).

La floculation et la granulation ont pour origine l'autoagrégation des microorganismes.

#### **3.1. Rôle de la MEC dans l'agrégation et la stabilité des biofilms**

##### ***3.1.1. Mise en évidence du rôle des protéines et sucres de la MEC***

L'ajout d'une faible quantité d'enzyme hydrolysant les protéines dans les boues activées provoque une défloculation. La défloculation est aussi observée (mais dans une moindre mesure) après ajout d'une enzyme hydrolyant les sucres (Higgins et Novak, 1997). Une expérience similaire sur des granules aérobies, montre au contraire un impact plus important de l'hydrolyse des sucres que de l'hydrolyse des protéines sur la structure du granule (Caudan, 2012). Les sucres et protéines de la MEC contribuent donc à la stabilité des agrégats. Par ailleurs, le blocage de voies métaboliques de synthèse des exopolysaccharides, empêche l'agrégation des microorganismes (Camarota et Sant'Anna., 1998 ; Yang et al., 2004).

### **3.1.2. La MEC et l'interaction cellule/cellule**

#### **3.1.2.1. La MEC neutralise les forces de répulsion des cellules**

Les particules, les cellules, et d'une manière générale, les agrégats sont chargés négativement en milieu aqueux, à pH neutre. Les cellules, ayant la même charge, se repoussent selon la théorie classique de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) (Bos et al. 1999 ; Liu et al., 2007). Différentes études ont montré que la production de MEC permet de diminuer cette charge négative et donc de favoriser la liaison entre les cellules (Schmidt et Arhing, 1994). Ainsi, en présence d'une faible teneur en MEC autour des cellules, l'adhésion est inhibée par les forces de répulsion électrostatique alors qu'en présence de davantage de MEC, l'adhésion est favorisée par les interactions polymériques (Tsuneda et al., 2003). Le taux de MEC est plus important dans les granules que dans les floes (Tay et al., 2001). La production de MEC accélère la granulation, mais une augmentation importante de la MEC diminue l'aptitude à la floculation (Wilen et al., 2003b).

#### **3.1.2.2. La MEC et l'hydrophobicité des cellules**

L'augmentation de l'hydrophobicité des surfaces cellulaires est corrélée avec l'adhésion des cellules au floc (Zita et Hermansson, 1997) et permet d'amorcer et stabiliser les granules (Liu et al., 2004a ; Guo et al., 2011). Quarmby et Foster (1995) montrent que lorsque la surface des cellules devient négative, le granule anaérobie n'est plus stable. L'hydrophobicité des granules se situe au niveau des PEC et non au niveau de la paroi des cellules puisqu'après extraction des PEC, l'hydrophobicité des cellules issues de boue granulaire, diminue (Guo et al., 2011). L'hydrophobicité de la surface des cellules est associée à la présence de structures fibrillaires et à la présence de protéines spécifiques (McNab et al., 1999 ; Singleton et al., 2001). Le support moléculaire de l'hydrophobicité des PEC s'oriente donc vers les protéines (acides aminés gly, ala, leu, ile, pro) (Lee et al., 2003 ; Liu et al., 2004b ; Adav et Lee., 2008) et non vers les polysaccharides, qui constituent plutôt la fraction hydrophile (Arabi et Nakhla., 2008). La composition des PEC liés va donc avoir un impact sur l'hydrophobicité : lorsque le ratio protéine/ sucre augmente, l'hydrophobicité augmente (Wang et al., 2006). Jorand et al., (1998) en travaillant sur des boues activées, montrent que 7% des PEC sont hydrophobes et que la fraction hydrophobe est constituée majoritairement de protéines particulièrement riches en acides aminés aromatiques. Mayer et al. (1999) avancent néanmoins que les polysaccharides acétylés peuvent former aussi une zone hydrophobe.

### **3.1.2.3. La nature des molécules de la MEC et leur implication dans l'adhésion des cellules**

Les protéines et les sucres sont les supports moléculaires traditionnels des PEC impliqués dans l'agrégation des cellules (O'Toole et al., 2000). Toutefois, la nature des espèces de la MEC qui initie l'agrégation est un sujet en cours.

#### ❖ Les sucres

Comme nous l'avons déjà mentionné, le blocage de voies métaboliques de synthèse des exopolysaccharides empêche l'agrégation des microorganismes (Camarota et Sant'Anna., 1998 ; Yang et al., 2004). Tay et al. (2001) pensent que les polysaccharides ont un impact sur la cohésion et l'adhésion des cellules dans les granules anaérobies puisque la formation des granules est accompagnée d'une forte augmentation des sucres par rapport aux protéines (Tay et al., 2001). Les auteurs soulignent le rôle possible des sucres dans la stabilisation des forces de répulsion des cellules. Liu et Fang (2002a) mettent en avant les capsules qui entourent les bactéries.

#### ❖ L'ADN

L'ajout de DNAase I pendant la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*, empêche l'établissement d'un biofilm (Whitchurch et al., 2002). L'observation microscopique d'un biofilm aquatique formé par *Gammaproteobacterium* montre de l'ADNe forme une structure définie de microfilaments d'ADN entre les cellules (Bockelmann et al., 2006, 2007).

Selon la nature de l'agrégat, il semble que la, ou les classes de molécules mises en jeu pour l'initialisation de l'agrégation cellule/ cellule soit variable. Les sucres sont susceptibles de participer fortement à l'initialisation de l'agrégation des cellules dans les granules.

### **3.1.2.4. Interaction de la MEC avec les cellules**

#### ❖ Présence de molécules dédiées à l'adhésion située sur les bactéries

Les lectines sont des protéines qui ont la particularité de pouvoir se lier à des sucres spécifiques. Les interactions entre lectines et sucres font intervenir des liaisons hydrogènes et

impliquent des acides aminés aromatiques pour la spécificité (Bush et al., 1999). Mirelman, (1986), montre que les lectines localisées sur les appendices des bactéries (fimbriae, pili), peuvent lier des sucres de la MEC. Higgin et Novak, (1997) ont mis en évidence que la MEC des boues activées contient une protéine possédant une activité « lectine-like ». Par ailleurs, le pili IV de la bactérie *Acidovorax temperans* se lie à l'ADNe impliqué dans l'interaction cellule/cellule (Heijstra et al., 2009).

#### ❖ Les cations divalents

Jiang et al. (2003) montrent que l'ajout d'ions Ca (100 mg/L) augmente la vitesse de granulation pour des boues granulaires aérobies. Ainsi la granulation est finie au bout de 16 jours au lieu de 32 jours. Liu et al. (2007) mettent en avant que les cations permettent de diminuer les forces de répulsion entre les cellules selon la théorie DVLO. Cependant, et selon cette théorie, l'ajout de cations monovalents devrait permettre de diminuer les forces de répulsion entre les cellules induisant une agrégation des cellules. Or, Higgins et Novak (1997) montrent qu'un ratio « cations monovalents/ cations divalents (Ca et Mg) » supérieur à 1, provoque la détérioration du floc. Ainsi, les interactions ioniques faisant intervenir les cations impliquent des cations non monovalents et ceux-ci interviennent plutôt pour la stabilisation des molécules de la MEC que pour l'agrégation directe cellule/cellule.

### ***3.1.3. La MEC et la stabilisation des agrégats biologiques***

La nature et surtout les proportions des différents composants de la MEC vont renforcer ou fragiliser l'agrégat.

#### **3.1.3.1. Composés influençant la stabilité de l'agrégat**

##### ❖ Nature des composés

*Composés organiques.* Le ratio des différents composés impacte la stabilité de l'agrégat (Liao et al., 2001). L'augmentation du taux de protéines et la diminution du taux de substances humiques-like favorise la capacité à la floculation (Wilén et al., 2003b). Wang et al., (2006) montrent que dans les granules stabilisés (60 jours), les protéines représentent 44% des PEC alors qu'elles ne représentaient que 38% au premier jour de la granulation. Ainsi les protéines semblent jouer un rôle dans la stabilité des agrégats.

*Composés minéraux.* Juang et al., (2010) montrent qu'une augmentation de la fraction minérale précipitée au centre du granule (Ca, Fe) est associée à la conservation de la stabilité de celui-ci. L'ajout de cations monovalents induit une détérioration du floc (Kara et al., 2008) alors que l'ajout de cations multivalents (Ca) induit une refloculation (Zita et Hermansson, 1994). Les cations multivalents tels que Ca (Morgan et al., 1991), Fe, Al (Yu et al., 2000, 2001) accélèrent le processus de granulation. Ainsi, les précipités minéraux à l'intérieur du granule sont susceptibles de le solidifier, alors que les cations multivalents interviendraient dans le pontage des molécules organiques des PEC (Higgin et Novak, 1997 ; Liu et al., 2007).

❖ Forme des composés et répartition.

*Forme des Minéraux.* La précipitation des ions Ca en  $\text{CaCO}_3$  (van Langerak et al., 2000) ou de Fe en FeS (Yu et al. 2000) liée à un excès exogène d'ions Ca ou Fe entraîne un dysfonctionnement du granule. Les précipités bloquent en effet les cavités intragranulaires. Pour les boues activées, la précipitation des ions Fe en FeS, liée à la croissance d'une bactérie anaérobie entraîne une défloculation (Wilen et al., 2000). Les auteurs attribuent ainsi aux ions Fe une implication dans le pontage des molécules organiques des PEC puisque leur diminution dans le floc induit une défloculation.

*Répartition des PEC.* Un excès de PEC faiblement liés par rapport au PEC fortement liés entraîne une diminution de la floculation dans les boues activées. Ainsi, Li et Yang (2007) montrent que la fraction de PEC faiblement liée affaiblit l'attachement des cellules.

*Répartition des Sucres.* Les sucres sont plutôt répartis dans la couche externe des granules. De Beer et al. (1996) ont mis en évidence que 50% des sucres sont présents dans une couche externe de 40  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les sucres de la couche externe sont liés en  $\beta$  (et non en  $\alpha$ ), ce qui confère aux granules de la rigidité (Sutherland, 2001a).

L'ajout de PEC exogènes (naturels ou synthétiques) aide au maintien de la stabilité du granule. Ainsi, l'ajout de chitosane, un polyoside chargé positivement à pH 7 et composé de glucosamine liée en  $\beta(1-4)$  et de N-acétyl-glucosamine (El-Mamouni et al., 1998; Tiwari et al., 2005), permet de renforcer la stabilité du granule. Le polymère exogène forme ainsi une

fine couche autour du granule (Ahn, 2000; Liu et al., 2003) et permet de neutraliser les charges du granule (Kalogo et al., 2001). Ce polymère possède, en outre, une bonne capacité à retenir l'eau, ce qui renforce la stabilité du granule (Imai et al., 1997) ; l'ajout de polymères anioniques tels que la lignine sulfonaté, permet parfois aussi d'améliorer la stabilité des granules (Tiwari et al., 2005). Les polymères exogènes interagissent donc avec les bactéries (surface négative) et la MEC (présence d'espèces chargées positivement et négativement).

### ***3.1.4. Les interactions dans la MEC issue de biofilm dédié aux traitements des eaux usées***

Peu d'informations existent sur l'interaction des cellules avec la MEC (PEC fortement lié). Ainsi, les gaines protéiques sont liées aux sucres de la membrane grâce aux protéines « lectine-like » et les capsules polysaccharidiques sont liées aux phospholipides des membranes par des liaisons covalentes. Différentes données existent sur l'interaction des différents composants de la MEC « entre eux ». Quelques aspects sont bien documentés comme le rôle des cations dans la structure des agrégats (Sobeck and Higgins, 2002). Analyser les interactions des composés de la MEC permet de montrer l'origine de la stabilité de l'agrégat.

Les protéines, les sucres et les cations multivalents semblent impliqués dans la formation et la stabilité du réseau de la MEC.

#### **3.1.4.1. Interactions faisant intervenir les cations multivalents**

Grotenhuis et al. (1991) ont décrit une désintégration ou un affaiblissement de la structure des granules anaérobies en présence d'éthylène glycol-bis ( $\beta$ -aminoéthyl éther)-acide N,N-tétraacétique (molécule qui se lie au calcium spécifiquement). De même, Caudan (2012) montre que l'ajout de savinase (protéase) sur des granules aérobies induit un relargage de matière colloïde organique et d'ions Ca. Le relargage d'ions Ca est aussi vérifié pour la moitié des essais lors de l'ajout de cellulase. Dès lors, il apparaît que l'ion Ca établit des ponts ioniques protéine/protéine ou protéine/sucre ou sucre/sucre selon la théorie CDB (« CDB : cation divalent bridging theory ») (Morgan et al., 1991 ; Sobeck and Higgins, 2002). L'ion Ca peut ainsi établir des liaisons ioniques :

- avec les groupes carboxyliques des acides uroniques ou des protéines (acides aminés asp, glu) (Sobeck et al., 2001),

-avec les groupes sulfates présents sur les sucres des archées (Sutherland, 2001) ou la partie glycosylée des glycoprotéines de la couche S de l'archée *Sulfolobus acidocaldarius* (Peyfoon et al., 2010).

Les cations multivalents pourraient avoir leur spécificité ou force d'interaction avec les molécules des PEC et en particulier avec les protéines. Ainsi Park et al. (2008) montrent une variation du profil massique des protéines issues de boues activées selon la méthode d'extraction. Ces méthodes mobilisaient des ions différents dans la MEC (Ca, Fe ou Al pour les extractions respectives : REC, sulfide ou base à pH10,5). Higgins et Novak (1997) ont montré qu'une augmentation des concentrations en Ca et Mg dans les boues activées induisait une augmentation de la teneur en protéines (et non en sucres). Cette observation pourrait indiquer que ces cations se lient plus spécifiquement aux protéines de la MEC. Concernant l'interaction sucre/sucre, Lin et al. (2010) ont décrit un « exopolysaccharide alginate-like » (« ALE ») dans les PEC issus de boue granulaire aérobie. La molécule ALE forme un hydrogel après ajout de CaCl<sub>2</sub>. La formation du gel dépend de la présence d'acides mannuronique et guluronique dans la structure ALE.

#### **3.1.4.2. Interaction ionique**

Des interactions ioniques directes peuvent aussi intervenir entre protéines et sucres (Sheng et al., 2010). Ainsi, les sucres ou autres molécules (dont les protéines) contiennent les groupes chargés négativement : groupe carboxylate, phosphate, sulfate. Les protéines contiennent les groupes amines chargés positivement : acides aminés lys, arg. Görner et al. (2003) ont pu démontrer qu'une protéine était fortement liée à un sucre.

#### **3.1.4.3. Interaction spécifique type substrat/ligand**

Par ailleurs, des molécules ont des fonctions dédiées à la reconnaissance et à la liaison aux motifs glucidiques (sucre, glycoprotéine). Ainsi, Higgins et Novak (1997) mettent en évidence une lectine dans les PEC des boues activées. Higgins and Novak (1997) ont par ailleurs observé un relargage de 75% de sucre, associé à un relargage de protéines, après avoir soumis la boue activée à une enzyme protéolytique. Les travaux de Park et Novak (2009) donnent cependant des résultats plus mitigés sur les lectines. Il semble que les lectines des PEC issues de boues activées soient surtout capables de se lier à des glycoprotéines et non à des glucides. Les glycoprotéines sont en effet, les seules molécules capables d'inhiber l'hémagglutination créée entre les lectines des PEC et les globules rouges.

Le modèle moléculaire des interactions ioniques faisant intervenir les cations multivalents ainsi que les interactions lectine/sucre trouvées dans la MEC des boues activées a été schématisée Figure A11.

### 3.1.4.4. Interaction hydrophobe

Comme nous l'avons déjà montré, l'hydrophobicité augmente durant la granulation grâce à la MEC (Guo et al., 2011). Des zones hydrophobes doivent donc exister dans la matrice. Le support moléculaire serait les protéines de la MEC (Jorand et al., 1998).

D'autres interactions (Van der Waals, hydrogène) et d'autres molécules sont susceptibles d'intervenir dans l'interaction entre les molécules des PEC telles que l'ADNe. Cependant, les investigations sont encore insuffisantes pour donner l'implication de l'ADNe dans la MEC issue de biofilm impliqué dans le traitement des eaux usées. Un modèle plus général de l'organisation de la matrice des biofilms est donné par Flemming et Wingender (2010) (Figure A12).

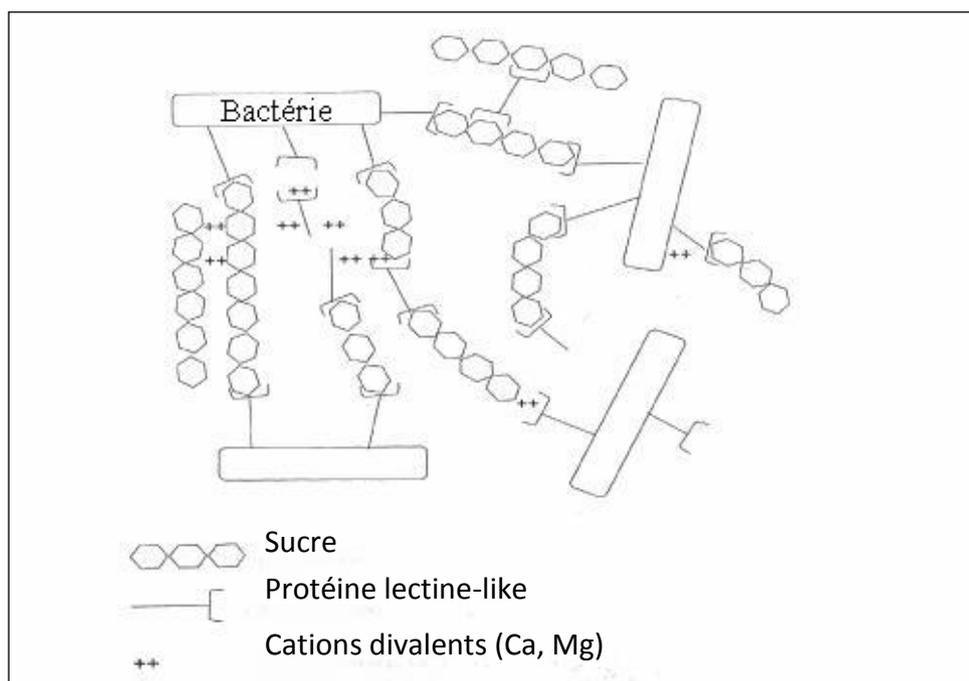


Figure A.10 : Modèle schématique des interactions entre les molécules de la MEC issue de boues activées (Higgins et Novak, 1997).

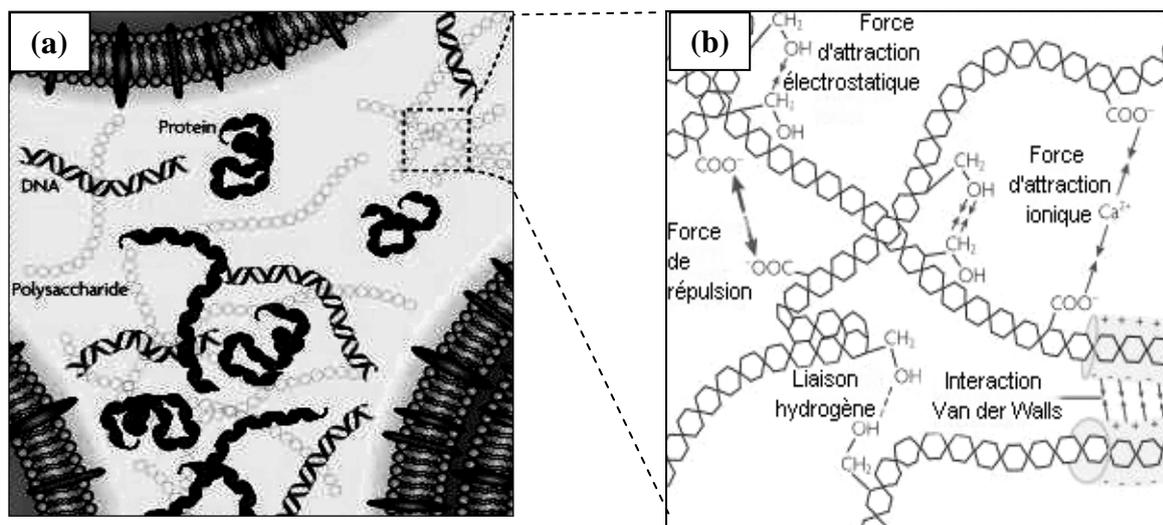


Figure A.11 : Modèle schématique des molécules de la MEC participant à l'interaction des cellules (a) et exemple d'interaction moléculaire entre motifs glucidiques (b) (Flemming et Wingender, 2010).

La MEC est impliquée dans la formation et la stabilité de l'agrégat, mais aussi dans certaines étapes des procédés de traitement des eaux des stations d'épuration classiques ou des bioréacteurs à membrane.

### 3.2. Impacts de la MEC dans les bioprocédés de traitement des eaux usées des stations d'épuration

#### 3.2.1. Décantation

Les tendances générales sur l'implication et la responsabilité de la MEC dans la décantation des boues est toujours un sujet en débat (Liu et Fang., 2003) malgré de nombreuses études. Une tendance générale commune est que l'augmentation de la teneur en PEC et du SVI (Sludge volume index) sont liés. Un SVI élevé traduit une mauvaise décantabilité (Jin et al., 2004). Cette tendance est liée aux répulsions électrostatiques entre deux floccs chargés négativement (Morgan al., 1990). En effet, les floccs ont une charge négative et la concentration totale des sites électrostatiques est de l'ordre de 20 à 30 fois plus élevée que sur les surfaces des bactéries (Liu et Fang, 2002a). Le taux de PEC faiblement lié a aussi un effet négatif sur la décantabilité (Li et Yang, 2007). En effet, ceux-ci, en se liant à l'eau, induisent la formation de floccs poreux. L'impact des composés spécifiques des PEC sur la décantabilité n'est pas encore élucidé.

### 3.2.2. Déshydratation des agrégats microbien

Les problèmes de déshydratation sont liés au fait que l'eau est fortement retenue dans les PEC des boues (Sutherland, 2001b). Ainsi l'eau est liée aux PEC par interactions électrostatiques (sites chargés en permanence ou dipôles induits) ou par liaison hydrogène (groupe hydroxyle des sucres, groupe amine des acides aminés lys, arg ...). Une augmentation de la quantité de PEC dans les eaux urbaines et industrielles diminue les capacités de déshydratation des boues Mikkelsen et Kieding (2003). Les protéines (et non les sucres pourtant hydrophiles) seraient responsables de l'interaction forte avec l'eau (Sponza, 2002) alors que la teneur en sucre améliore la déshydratation (Jin et al., 2004).

### 3.2.3. Colmatage des membranes

Les SMP sont responsables du colmatage des membranes dans les bioréacteurs à membrane (BMR) (Judd, 2008) (Figure A13). Ces substances proviennent de molécules contenues dans les boues activées et transférées vers la phase soluble (Rosenberger et al., 2006). Dans les bioréacteurs à membrane, les contraintes de cisaillement auxquelles sont soumises les boues activées (Wisniewski et Grasmick, 1998), ainsi que le stress induit par les variations du milieu (Bott et Love, 2002) contribuent à augmenter la fraction soluble. Le temps de rétention des boues dans les BMR est lié à une augmentation des SMP en particulier des UAP (Ni et al., 2011). Les sucres ont une forte influence sur le colmatage.

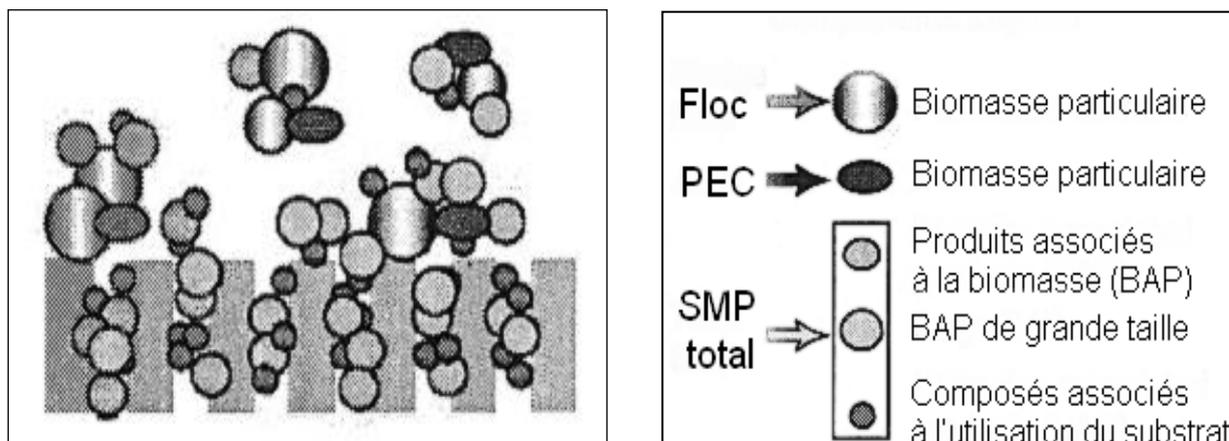


Figure A.12 : Représentation schématique du colmatage des membranes dans un bioréacteur à membrane (Ni et al., 2011).

## *Chapitre A-2 : Méthodes d'extraction de la MEC*

---

Comme nous venons de le démontrer, la MEC est une structure complexe. Son étude nécessite différentes méthodologies d'extraction en vue d'une meilleure compréhension de son organisation. Chaque méthode d'extraction a sa spécificité mais aussi ses désavantages. L'étude des méthodes d'extraction est proposée dans le chapitre suivant.

## **1. Procédure d'obtention de la MEC à partir des boues**

Pour l'étude des PEC de la MEC, l'idéal est de travailler à partir de boues fraîches. La durée de stockage maximale est de 24h pour les boues activées (Comte et al., 2006) et de 48 h, pour les granules (D'Abzac et al 2010a). Les boues fraîches sont conservées entre 1 et 4°C. Cette température réduit l'activité enzymatique pouvant altérer les molécules organiques des PEC (Wingender et al., 1999). La lyophilisation et la congélation des boues entraînent *i*) une modification de la MEC (degré de polymérisation des molécules) *ii*) une augmentation de la perméabilité des cellules *iii*) ainsi que la lyse des cellules (Klock et al., 2007).

Une procédure classique d'extraction (Nielsen et Jahn, 1999) de la MEC démarre par le prétraitement des boues. Pour les boues granulaires, denses et compactes, un lavage (D'Abzac et al., 2010a) une homogénéisation mécanique (McSwain et al., 2005) peuvent être appliqués. Pour les boues activées, une pré-concentration est appliquée par centrifugation douce de 4000 x g (Comte et al., 2006) ou déshydratation par évaporation sous vide (Ahmidou et al., 2007). La procédure se poursuit par l'extraction, dont le choix de méthode dépend de l'analyse envisagée et du type d'agrégat. Enfin la séparation de la biomasse et de la MEC extraite est effectuée par centrifugation (sauf pour des extractions à l'éthanol), la fraction de la MEC se trouvant dans le surnageant. La purification éventuelle des extraits est réalisée par des précipitations successives (Denecke, 2006), par dialyse (Anderson et al., 2009) ou en filtrant les échantillons à 0,22 µm (Brown et Lester, 1980). Les étapes de préparation des boues et de purification de la MEC ne sont pas systématiquement appliquées.

## 2. Evaluation de la méthode d'extraction

Une méthode idéale d'extraction des matrices extracellulaires issues des boues répond aux trois critères suivants (Gehr et Henry, 1983 ; Frølund et al., 1996 ; Liu et Fang, 2002b) :

- efficacité de l'extraction (bon rendement d'extraction),
- limitation de la lyse cellulaire,
- limitation de l'altération de la structure de la MEC.

### 2.1. Rendement de la méthode d'extraction

Par définition le rendement d'extraction est la quantité de MEC extraite en fonction de la quantité de MEC totale dans le biofilm (Wingender et al., 1999), or la quantité de MEC totale du biofilm est encore techniquement impossible à évaluer. Cependant, une approche consiste à appliquer des extractions successives (Ras et al., 2008 ; Caudan, 2012) et à modéliser les quantités de PEC extraites. Il n'existe aucune méthode d'extraction de référence. La méthode « centrifugation » est une méthode d'extraction physique qui permet de séparer par gravité la phase soluble contenant la matrice extracellulaire des cellules des boues. Cette méthode est considérée comme une méthode de contrôle car aucune lyse bactérienne n'est provoquée, son rendement d'extraction est néanmoins faible et se limite principalement qu'à des PEC solubles.

Le terme « rendement d'extraction PEC » est inapproprié, dans la plupart des cas, les données sont normalisées par rapport à la biomasse totale (Nielsen et Jahn, 1999). Par extension, le rendement d'extraction de la MEC est la quantité de MEC extrait en fonction de la quantité de biomasse. Les unités d'expression ne sont pas standardisées dans la littérature: la quantité de PEC peut être fonction de la masse de matière organique volatile (mg/g MVS), de la masse de carbone organique total (mg/g COT).

Urbain et al. (1993), Frølund et al. (1995, 1996) ont montré que la technique d'extraction influençait le rendement d'extraction ainsi que la composition de l'extrait. Par ailleurs, une technique d'extraction est fonction de la compacité du biofilm comme le montre le Tableau A5. Ainsi, la sonication n'est pas plus efficace que la centrifugation pour extraire la MEC issue de granules alors qu'elle l'est pour les boues activées. A l'inverse, la résine échangeuse de cations qui associe un traitement physique (mélange des boues avec des billes de résine et

cisaillement) et chimique (échange de cations Na/ autres cations de la MEC) est plus efficace sur les boues granulaires. Les extractions chimiques ont en général un meilleur rendement que les extractions physiques. Toutefois le rendement des méthodes chimiques est biaisé car l'extractant intégré à la MEC extraite, en augmente la masse. Comte et al. (2007) décrivent en effet, des chromatogrammes atypiques lorsque la MEC est extraite par l'EDTA. Les auteurs concluent qu'il existe une réaction possible entre l'EDTA et les molécules de la MEC telle que la formation d'un complexe (Liu et Fang., 2002b). Comte et al. (2006a) et D'Abzac et al. (2010a) ont prouvé la présence de contaminant chimique dans les MEC analysées par spectrométrie infrarouge. D'Abzac et al. (2010a) ont déterminé des rendements d'extraction supérieurs à 100% , pour l'extraction « formaldéhyde + NaOH » ou « éthanol ».

Enfin, les conditions expérimentales de l'application d'une méthode d'extraction influence son rendement : Frølund et al. (1996) ont notamment montré que des temps d'extraction importants, associées à un mélange intensif permettaient d'obtenir un meilleur rendement qu'avec des temps plus courts. De même, Adav et Lee (2011) montrent que l'ordre d'application des traitements d'extraction est à prendre en compte : la sonication appliquée en amont de l'application d'extractants chimiques améliore le rendement d'extraction pour des granules aérobies. L'ordre inverse altérerait les molécules extraites.

Tableau A.5 : Rendement d'extraction en fonction du type de biofilm et du type d'extraction.

Méthode d'extraction	Rendement d'extraction (MS (g) MEC/ MS (g) biomasse), en %		
	Boue granulaire anaérobie D'Abzac et al., 2010a	Boues activées Comte et al., 2006a	Culture bactérienne Metzer et al., 2009
Centrifugation	5,3	1,0	/
Sonication	5,2	2,3	/
REC	12,9	3,1	8,8
EDTA	70,1	19,2	14,4

## 2.2. Estimation de la lyse cellulaire

L'évaluation de la lyse cellulaire est difficile. Brown et Lester (1980) ont proposé de déterminer le taux de classe de molécules organiques spécifiques du milieu intracellulaire tel que le taux de protéine et d'acide nucléique. Cependant, la matrice extracellulaire contient un taux important de protéine et un taux non négligeable d'acide nucléique. L'ADN extracellulaire (ADNe) est une composante du biofilm (Molin et Tolker Nielson, 2003)

retrouvée dans les eaux usées (Frølund et al., 1996). Un taux élevé d'acide nucléique témoigne néanmoins d'une lyse cellulaire.

La lyse cellulaire peut aussi être évaluée par des marqueurs spécifiques intracellulaires tels qu'une activité enzymatique. Ainsi l'activité l'adénosine triphosphatase, ou encore la G6P-DH (glucose 6-phosphate déshydrogénase) (Mc Swain et al., 2005) peut être mesurée. Toutefois l'activité enzymatique est très sensible aux conditions physicochimiques du milieu ainsi qu'à des molécules inhibitrices (Poulin et al., 1992), susceptibles d'être présentes dans les boues ou l'extractant s'il est chimique. Cette méthode couramment utilisée ne prend pas non plus en compte la diffusion des réactifs au sein de la boue dans la mesure où celle-ci est un granule. L'ensemble de ces méthodes est basé sur des molécules non stables au cours du temps (Frølund et al., 1996). Ce choix d'indicateur de lyse cellulaire est donc discutable. L'étude de Liang et al. (2010), montre une discordance entre le taux d'ADN et l'activité G6P-DH pour la MEC issue de boues activées. Ainsi, pour les extractions par NaOH et sonication, le taux d'ADN est respectivement de 2,1 et 1,4 mg/g MVS et 4,1 et 8,4  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mL}$  pour l'activité G6P-DH.

Sheng et al. (2005) ont mesuré la présence d'un marqueur spécifique issu de bactéries photosynthétiques : les pigments photosynthétiques intracellulaires sont détectés par spectrométrie-UV. Cette technique est pertinente mais ne peut s'appliquer pour des boues activées et encore moins pour des boues granulaires exemptes de microorganismes photosynthétiques. Cette étude met néanmoins en corrélation l'augmentation du taux d'acide nucléique avec la présence d'un pic correspondant au pigment photosynthétique intracellulaire.

Pour l'extraction à l'EDTA, le ratio Protéine/Sucre est de 9,1 (il est de 1,5 pour l'extraction avec centrifugation) avec des paramètres incontestables d'absence de lyse cellulaire : faible taux d'acide nucléique et pas de présence de pic de pigment photosynthétique détecté (Sheng et al., 2005). Ce ratio est beaucoup plus élevé par rapport aux données de certains auteurs. Les ratio Protéine/Sucre doivent être faibles. D'une manière générale et selon Adav et Lee, (2008a), pour les boues activées, le ratio est compris entre 1 et 2 ; pour les boues granulaires, entre 3 et 6, afin de garantir une absence de lyse cellulaire. Liang et al. (2010), en étudiant une boue activée, confirme que l'EDTA est une méthode avec un bon rendement d'extraction et une absence de lyse cellulaire (faible taux d'ADN et faible activité GP-DH).

Enfin des méthodes consistent à vérifier l'intégrité de la paroi cellulaire (Liang et al., 2010) via des méthodes microscopiques difficiles à mettre en œuvre dans des boues où les cellules sont agrégées dans une structure complexe (Urbain, 1992). Adav et Li (2008) ont dosé un constituant de la paroi cellulaire bactérienne, le KDO (3-desoxy-D-manno-2- octulosonique). Ces méthodes ne permettent pas néanmoins d'évaluer le matériel intracellulaire dispersé dans l'extrait. De plus, le KDO est un motif moléculaire situé à l'extérieur de la cellule, il se situe donc dans la MEC.

L'estimation de la lyse cellulaire dans l'extraction de la MEC est discutable selon les méthodes appliquées. La détection des pigments photosynthétiques est une méthode pertinente mais limitée à un type de biofilm contenant une majorité d'organismes photosynthétiques.

L'évaluation de la lyse cellulaire n'est pas toujours vérifiée dans la littérature.

Parmi les méthodes induisant une lyse cellulaire, la littérature mentionne principalement l'ajout de NaOH (Sheng et al., 2005) ou encore la chaleur (Azeredo et al., 1999). Le formaldéhyde ajouté avant le traitement au NaOH permet de limiter la lyse cellulaire (Liu et Fang, 2002b).

### **2.3. Evaluation de l'altération de la structure des PEC**

Les extractions basées sur des traitements thermiques ou l'utilisation de NaOH (pH > 9) peuvent provoquer la dégradation ou la désorganisation des macromolécules présentes dans la MEC. Les protéines par exemple, sont impactées par ces environnements. Les acides uroniques sont dégradés à des pH alcalins (pH > 9) (Sheng et al., 2010).

L'impact des extractants sur la composition organique de la MEC peut être évalué en fonction de différentes caractéristiques des molécules des PEC. Ainsi, la modification de la taille des molécules est mise en évidence par chromatographie d'exclusion stérique haute pression (HPLC-SEC) (Frølund et al., 1996 ; Görner et al., 2003 ; Garnier et al., 2005). L'extraction avec l'EDTA donne un chromatogramme atypique présentant un pic unique d'une très forte intensité (Comte et al., 2007 ; Ras et al., 2011). Comte et al. (2007) suspecte l'EDTA d'interagir avec la MEC en formant un complexe. L'impact sur les groupes fonctionnels chimiques caractéristiques des classes de molécules organiques est visualisé par des spectres

infrarouges (Comte et al., 2006a ; D'Abzac et al., 2010a). Les extractants « glutaraldéhyde » et « formaldéhyde » sont ainsi suspectés de réagir avec les groupes amines des protéines ou des sucres présents dans la MEC. Enfin, la réactivité de la MEC vis-à-vis de sa capacité à interagir avec les métaux (D'Abzac et al., 2010c ; Comte et al., 2007) est variable en fonction du type d'extraction. Rudd et al. (1984) suspectent les propriétés complexantes des PEC extraits d'être altérés lors de l'extraction (physique ou chimique). Par exemple, de nouveaux sites de sorption peuvent être formés pendant la désorganisation de la matrice de biofilm. La formation de complexe EDTA-MEC peut gêner l'accès à des sites par encombrement stérique de l'EDTA lié à la MEC.

Ainsi, l'interprétation de la part de molécules sélectionnées par la méthode d'extraction et celle modifiée par l'extractant s'avèrent difficile.

Par ailleurs l'impact de la méthode d'extraction n'est pas pris en compte pour la fraction minérale de la MEC d'autant plus que celle-ci n'est pas ou très peu étudiée. Les méthodes d'extraction sont en effet prévues pour les PEC (fraction organique). Ainsi les méthodes chimiques utilisant des bases ou des acides peuvent former ou détruire des précipités minéraux. L'ajout d'extractant chimique peut modifier la composition de la part minérale et/ou sa forme, de même que les méthodes basées sur des échanges ioniques (Résine échangeuse de cations, REC) ou de capture ionique (EDTA, couronne d'éther). Wuertz et al. (2001) mettent ainsi en avant que l'extraction par la couronne d'éther interagit seulement avec les métaux alcalin et alcalino-terreux et non avec les métaux de transition ou les métaux pauvres comme peut le faire l'EDTA. Comte et al. (2007b) décrivent ainsi la forte diminution de la capacité de complexation du Cd et du Pb par la MEC (partie minérale et/ou organique) extraite avec le glutaraldéhyde.

### **3. Choix de la méthode d'extraction**

L'extraction de la MEC est basée sur des méthodes physique ou chimique ou biologique. Une combinaison des différentes méthodes est aussi envisageable. La plupart des méthodes sont adaptées de l'extraction des PEC issus de cultures de souches bactériennes. Une adaptation pour l'extraction de la MEC issue de biofilm de compacité et complexité plus importante (floc, granule) est décrite dans la littérature.

Les modes d'action de quelques méthodes d'extraction de la MEC sont présentés Tableau A7. Les méthodes physiques d'extraction de la MEC sont basées sur la dispersion de la boue afin de libérer la MEC (centrifugation, sonication, température, résine échangeuse de cations). Les méthodes chimiques sont basées sur l'ajout de réactifs chimiques qui agissent sur les groupes organiques chargés ou les cations de la MEC (EDTA, formaldéhyde + NaOH, glutaraldéhyde). Les méthodes biologiques ciblent une molécule organique spécifique.

### 3.1. Extraction de la MEC faiblement liée et de la MEC fortement liée

La MEC est composée de molécules plus ou moins liées aux cellules de la matrice. La littérature propose des protocoles d'extraction en fonction de la force de liaison aux cellules (Poxon et Darby, 1997; Ramesh et al., 2006; Li and Yang, 2007; Yu et al., 2007; Alasonati et Slaveykova, 2012) (Tableau A6).

Tableau A.6 : Méthode d'extraction séquentielle de la MEC soluble, de la MEC faiblement et fortement liée.

Références	Tsai et al., 2008 (boues activées de bioréacteur à membrane)	Yu et al., 2009 (granules aérobies)
SMP ou MEC soluble	Centrifugation 6000 g, 10 min	Centrifugation 2000 g, 15 min
MEC faiblement liée	Suspension du culot de l'étape précédente dans une solution saline de NaCl (0,85 %) Sonication 330 W/L, 2 min Centrifugation 8000 g, 10 min	Suspension du culot de l'étape précédente dans un tampon phosphate Centrifugation 5000 g, 15 min
MEC fortement liée	Suspension du culot de l'étape précédente dans une solution saline de NaCl (0,85 %) Sonication 330 W/L, 2 min Chauffage 80°C, 30 min Centrifugation 8000 g, 10 min	Suspension du culot de l'étape précédente dans un tampon phosphate Sonication 4800 W /L, 10 min Centrifugation 20 000 g, 20 min

La différence entre MEC faiblement liée et fortement liée se base sur la méthodologie et est donc opérationnellement définie. Pour faciliter les protocoles (éviter de concentrer la fraction de MEC par précipitation ; Tsai et al., 2008), les protocoles d'extraction s'attachent surtout à séparer séquentiellement la MEC faiblement et fortement liée. Il existe ainsi des méthodes douces d'extraction pour la MEC faiblement liée (et soluble), et des méthodes plus drastiques

pour extraire la MEC fortement liée (à partir du culot de centrifugation) (Song et al., 2010). Le lavage des boues activées (par centrifugation et remise en suspension du culot) permet aussi d'éliminer la MEC très soluble (Comte et al., 2006a). Certains auteurs utilisent les termes MEC « faiblement liée » et « fortement liée » à l'issue, respectivement, des extractions « par centrifugation » et « par une autre méthode plus drastique » (Villain et al., 2010). Dans ce cas, la MEC « fortement liée » obtenue contient aussi la fraction de MEC faiblement liée.

La centrifugation est une méthode douce qui ne permet pas de déstabiliser la matrice des boues, cette méthode permet l'extraction de la MEC faiblement liée. Par ailleurs, c'est aussi une méthode « contrôle » car c'est une étape indispensable à l'issue de chaque protocole d'extraction. La quantité de PEC extrait est faible par rapport aux autres méthodes d'extraction (Liu et Fang, 2002b; Tableau A5).

Les autres méthodes (Tableau A7), plus drastiques, permettent de suffisamment désorganiser la matrice afin d'extraire la MEC fortement liée. Selon la méthode choisie, une fraction plus ou moins importante est extraite et sa composition est variable.

La méthode d'extraction la plus fréquemment employée dans la littérature est la résine échangeuse de cations (REC) (Frølund et al., 1996). En effet cette méthode ne provoque pas de lyse cellulaire, elle permet un bon rendement d'extraction des PEC issus des biofilms, des boues activées et des granules (Jahn et Nielsen, 1995 ; Nielsen et al., 1996 ; McSwain et al., 2005; Denkhaus et al., 2007). Selon Dignac et al. (1998) cette méthode ne contamine pas les échantillons contrairement aux extractants chimiques. Cette méthode a aussi l'atout de ne pas interférer avec certaines méthodes de dosage colorimétrique (Ras et al., 2008).

D'une manière générale, les méthodes chimiques telles que (REC) (Frølund et al., 1996), EDTA (Sheng et al., 2005) et formaldéhyde + NaOH (Liu et Fang., 2002b), plus agressives, ont un meilleur rendement d'extraction des PEC que les méthodes physiques, quelsoit le type de boue (Liu et Fang, 2002b; Sheng et al., 2005; Comte et al., 2006a ; D'Abzac et al., 2010a; Adav et Lee, 2011). Aucune de ces méthodes ne peut extraire la totalité de la MEC.

Tableau A.7 : Modes d'action de différentes méthodes d'extraction de la MEC à partir de boues activées ou granulaires.

Méthode d'extraction	Mode d'action	Références
Centrifugation 2000 g, 15 min	Séparation par gravité de la biomasse (cellules et MEC liée) de la phase soluble.	Liu et Fang 2002b
Centrifugation 20 000 g, 20 min	Une partie des « PEC liés » est arrachée de la surface des cellules	Liu et Fang 2002b
Sonication	Déstructuration mécanique par cisaillement des structures chimiques entre les PEC	Wang et al. 2006
Chaleur	Les mouvements moléculaires sont accélérés, les molécules organiques sont dénaturées, la dissolution de la MEC est accélérée.	Li et Yang, 2007
Résine échangeuse de cations (REC)	Agitation, homogénéisation, cisaillement de la matrice et échange des ions Na de la résine avec des cations mono ou di ou trivalents de la matrice. Les ions Ca et Mg sont des agents pontants de la MEC, leur diminution déstabilise la MEC	Jahn et Nielsen, 1995 Frølund et al., 1996
Les agents chélatants : EDTA Ou Ether couronne Ou Sulfure	Les éthers couronnes se fixent spécifiquement aux métaux divalents de la matrice : ion Ca. L'EDTA est moins spécifique, il forme un complexe avec les cations divalents : Ca, Mg Les sulfures peuvent former avec les ions FeII ou FeIII, un précipité de FeS  Les ions Ca et Mg, et Fe sont des agents pontants de la MEC, leur diminution déstabilise la MEC	Wuertz et al., 2001  Fang et Jia, 1996  Park et al., 2008
Les aldéhydes : Formaldéhyde Ou Glutaraldéhyde	Les aldéhydes se fixent aux parois cellulaires en réagissant avec les groupes carbonyles, amines ou hydroxyles. Cette fixation diminue la lyse cellulaire et libère la MEC en interaction avec ces groupes fonctionnels.	Liu et Fang, 2002 Adav et Lee, 2008 Azeredo et al., 1999
NaOH	L'augmentation du pH induit l'ionisation d'un grand nombre de molécules de la MEC et génère alors la répulsion des PEC chargés négativement. L'ajout de formaldéhyde avant NaOH permet de réduire la lyse cellulaire	Brown et lester, 1980  Liu et Fang, 2002b
Ethanol	Dénature les PEC et diminue les forces d'interaction entre la MEC et les cellules	Foster et Clarke, 1983
Biologique Enzymes	Les enzymes hydrolysant spécifiquement certains sucres ( $\alpha$ amylase) ou les protéines (endopeptidases) découpent certains PEC et déstabilisent la MEC.	Sesay et al., 2006 Caudan, 2012

### **3.2. Extraction des PEC en fonction de leur polarité et charges**

Afin d'altérer les interactions hydrophobes, il faut utiliser des surfactants comme les détergents (Tween 20), l'éthanol, le méthanol, l'hexane ou le benzène. La perturbation des interactions hydrophobes entraînera la libération des polysaccharides et des protéines. Ras et al. (2008), ainsi que Purohit et al. (2003) mettent en évidence des rendements d'extraction plus élevés avec le Tween 20 comparés à l'extraction « éthanol », sur les boues activées avec un rapport Protéine/Sucre de 3. Dans cette même étude, l'extraction par l'EDTA permet de doubler le rendement de MVS des PEC. Lors d'une extraction séquentielle sur des granules aérobies, Caudan (2012) montre que l'EDTA permet d'extraire 5 fois plus de PEC que le Tween 20, alors que cette étape d'extraction précède l'EDTA. Le ratio Protéine/Sucre est de 8,3. Avec la même méthode d'extraction séquentielle, l'auteur montre que le % de PEC extrait par le Tween 20 est équivalent au % de PEC extraits par l'EDTA à partir de boues issues d'un réacteur SBR. Ces résultats montrent que dans un granule les PEC hydrophobes sont soit plus difficiles à extraire, soit leur taux est faible par rapport aux boues flocculantes.

Afin d'altérer les interactions ioniques, plusieurs stratégies sont possibles. Les différences de charge entre les espèces de la MEC peuvent être neutralisées par ajout d'acide ou de base. Les cations pontant les PEC de la MEC peuvent être mobilisés (retirés) grâce à des agents chélatants (EDTA, couronne d'éther, sulfure) ou grâce à des échanges ioniques (REC). Il est à noter que la fraction impliquée dans des interactions ioniques est majoritairement protéique. Cette tendance est particulièrement vraie pour la MEC extraite par le Formaldéhyde + NaOH issue des boues granulaires, ceci est confirmé par l'étude de D'Abzac et al. (2010a).

### **3.3. Extraction des PEC en fonction de la nature, la classe de molécule organique**

Cette étude se limite aux protéines et sucres car les résultats de la littérature ne décrivent pas systématiquement l'évolution des taux de substances humiques-like ou d'acides uroniques. Ainsi, pour évaluer la spécificité d'extraction, il faut regarder l'évolution des rapports Protéine/Sucre en fonction de la méthode d'extraction. Comme le montre le Tableau A8, les procédures REC, EDTA et formaldéhyde + NaOH ont des rapports Protéine/Sucre ( $> 1$ ) pour les boues activées ; ( $> 1,4$ ) pour les boues granulaires. Pour la centrifugation, ces rapports étaient inférieurs : de (1) pour les boues activées et de (1.4) pour les boues granulaires.

Tableau A.8 : Exemple de composition biochimique des échantillons de PEC extraits à partir d'une boue activée et d'une biomasse granulaire anaérobie par différentes méthodes (Liu et Fang 2002b).

Boue activée	Prot. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Polysac. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Subst. Hum. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Ac. Uro. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Ac. Nuc. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Prot/Polysac
Centrif.	7,9	7,7	6,4	0,5	0,1	1.0
REC	17,6	12,7	16,4	1,2	0,1	1.4
EDTA	22,9	12,4	59,2	2,1	0,5	1.8
Form. + NaOH	54,6	40,5	50,4	4,2	0,4	1.3
Boue granulaire anaérobie	Prot. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Polysac. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Subst. Hum. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Ac. Uro. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Ac. Nuc. (mg.g <sup>-1</sup> boue)	Prot/Polysac
Centrif.	5,8	4,1	3,1	0,3	< 0,1	1.4
REC	10,6	7,9	5,5	0,9	0,1	1.3
EDTA	12,0	6,8	24,3	1,2	0,3	1.7
Form. + NaOH	42,1	19,1	23,3	2,1	0,2	2.2

Azeredo et al. (1999) montrent également que sur deux biofilms différents, la méthode « température » permet d'extraire davantage de protéine ( $1 < \text{Protéine/Sucre} < 21$ ). Zhang et al. (1999) montrent de même une augmentation du rapport Protéine/Sucre par une extraction à la chaleur et à la REC sur des biofilms (le rapport Protéine/Sucre est d'environ 0,1 pour la centrifugation et d'environ 0,4 pour la chaleur). Les extractions REC, EDTA, Formatdéhyde + NaOH, et chaleur seraient plus spécifiques de l'extraction des protéines.

A l'inverse, des méthodes d'extraction sont plus spécifiques « des sucres » : c'est le cas du glutaraldéhyde (Azeredo et al., 1999) ou du formaldéhyde (Zhang et al., 1999).

### 3.4. Extraction de la partie minérale de la MEC

Peu de travaux ont été réalisés sur cette fraction. Les résultats sont traditionnellement exprimées / g MVS de PEC ou /g C de PEC. Par ailleurs, la fraction minérale est directement observée en microscopie électronique dans la matrice, sans étape d'extraction (sur le biofilm d'une eau naturelle (Julien, 2011) ou les boues activées (Guibaud et al., 2009)). Julien (2011) a néanmoins réalisé une extraction séquentielle « BCR (Bureau Commun Reference) » à partir du biofilm pour décrire la distribution des différents éléments dans des conditions d'attaque chimique de force variable. Ce traitement chimique est suivi par une centrifugation douce. Toutefois, seule la première attaque chimique est suffisamment douce pour ne pas induire une

lyse cellulaire. Il serait néanmoins pertinent d'appliquer cette méthode séquentielle après une extraction classique de la MEC. Il est certain néanmoins que les méthodes classiques d'extraction permettent d'extraire des minéraux sous différentes formes :

- Garnier et al. (2005) ont extrait la MEC issue de boue activée par la REC. Ils ont mis en évidence par analyse infrarouge, après séparation en CES, du kaolin ainsi qu'une phase carbonate associée avec des protéines ou des polysaccharides ou des sels d'acides organiques ;
- Julien (2011) met en évidence des minéraux (Ca, Mg Fe et Mn) liés aux carbonates sur les biofilms, après extraction à l'acide acétique pH 7 ;
- Guibaud et al. (2009) ont extrait la MEC par sonication sur des boues activées. Le dosage du minéralisat par spectrophotométrie d'absorption atomique flamme, montre la présence de Fe, Mn, Al ;
- Caudan (2012) décrit un relargage de Ca après hydrolyse enzymatique par une cellulase ou une salivase (protéase) sur des granules aérobies.

Les travaux antérieurs au laboratoire permettent de mettre en évidence l'impact de méthodes d'extraction usuelles sur le rendement d'extraction de la fraction minérale en fonction de la MEC totale issue de boues activées ou de granules anaérobies (Tableau A9).

Tableau A.9 : Fraction minérale dans différentes boues et selon plusieurs méthodes d'extraction (MM : Masse Minérale).

Methodes d'extraction	MEC de boues activées Comte et al., 2006a MM/MS (%)	MEC de granules anaérobies D'Abzac et al., 2010a MM/MS (%)
Centrifugation	26	41
Chaleur	11	38
Sonication	14	39
REC	30	52
Formaldhyde + NaOH	40	58
EDTA	30	45
Glutaraldéhyde	3	/
Ethanol	/	25

Les boues granulaires sont plus minérales que les boues activées, l'apport de Ca et Fe étant impliqué dans la granulation comme agent pontant (Liu et al., 2002) ou comme site de nucléation minérale (Dupraz et al., 2009). D'après le Tableau A9 (lignes non grisées), les extractions physiques ont un meilleur rendement pour l'extraction de la fraction minérale que

les extractions chimiques « glutaraldéhyde ou éthanol ». Par ailleurs, le taux de fraction minérale est plus important dans la MEC faiblement liée (centrifugation) que dans la MEC fortement liée (chaleur, sonication). D'Abzac et al. (2010b), après minéralisation totale de la MEC, constate un apport exogène de minéraux dû à la méthode d'extraction (ligne grisées) : apport de Na par REC, lié à l'échange Na/ Ca, Mg, et apport de Na par les produits chimiques eux même (EDTA disodique et NaOH dans formaldéhyde + NaOH). Les auteurs constatent une diminution des cations Ca et Mg dans la fraction minérale extraite par REC, ceux-ci s'étant liés à la résine. Avec l'extraction Formaldéhyde + NaOH, les taux les plus importants d'Al sont décrits, les auteurs expliquent que l'augmentation du pH, générée par l'apport de NaOH, induit la dissolution des complexes tels que le phosphate d'aluminium. A l'inverse l'augmentation du pH induit une précipitation des éléments Mn, Ag, Pb et Cd sous forme de carbonate ou hydroxyde, ceci explique les taux faibles de ces éléments. L'analyse de la fraction minérale en fonction des différentes méthodes d'extraction permet en outre de remonter à la caractérisation (composition minérale, forme soluble, précipité...) minérale des boues.

### **3.5. Extraction des de la MEC et interferences**

L'extraction à l'EDTA mérite une observation particulière. Ainsi, Sheng et al. (2005) montrent que l'extraction par l'EDTA est la méthode la plus sélective des protéines (protéines extraites :83% (g/g EPS extraits)) et que cette méthode permet un bon rendement d'extraction (six fois plus D'EPS extraits par rapport à l'extraction témoin), sans lyse cellulaire. Ces résultats contredisent d'autres études menées sur des PEC extraits de trois boues granulaires anaérobies. En effet, D'Abzac et al. (2010a) trouvent un rapport Protéine/Sucre en faveur des « sucres » pour une boue granulaire, le rapport Protéine/Sucre est supérieur à 1 mais reste faible pour les deux autres boues granulaires (2,1 et 2.9). De plus, Comte et al. (2006a) ne donnent pas le taux de protéines lors de l'extraction à l'EDTA. En effet, les interférences entre des réactifs de dosage (Lowry modifié, Frølund et al., 1999) et l'EDTA, qui est présent dans la MEC, malgré une étape de dialyse, rendent le dosage ininterprétable.

L'EDTA présent dans la MEC ou l'apport de sel (apporté par les méthodes d'extraction telles que la REC ou le NaOH) peuvent modifier certaines caractéristiques de la MEC. Ainsi, les capacités de fixation des métaux (Comte et al., 2006b) est très élevée pour l'extraction à

l'EDTA. Ces auteurs soulignent aussi que l'EDTA modifie le profil de la MEC séparée par CES/UV et fait l'hypothèse d'une modification liée à la présence d'EDTA dans la MEC.

Les méthodes qui utilisent des aldéhydes (formaldéhyde + NAOH, glutaraldéhyde), sont susceptibles d'induire une modification des molécules (Liu et Fang, 2002b), à l'origine d'une difficulté d'interprétation de résultats : *i*) diminution de la capacité de fixation des métaux par la MEC (Comte et al., 2006b) ; *ii*) spectre infrarouge de la MEC modifié (Comte et al., 2006a; D'Abzac et al., 2010a). De même, la présence de glutaraldéhyde interfère avec les réactifs colorimétriques impliqués dans le dosage des protéines, substances humiques-like, polysaccharides, acides uroniques, lipides et acides nucléiques (Comte et al., 2006a).

Dans la littérature l'analyse du choix de la méthode d'extraction en fonction du mode de détection de l'espèce ou un paramètre de l'espèce, reste floue. Ainsi, Ras et al. (2011) ont effectué une séparation de la MEC par CES/UV. La MEC était extraite par l'EDTA des biofilms. Les auteurs interprètent que l'EDTA ne permet qu'une extraction faible et limitée à une seule fraction de masse moléculaire. Cette conclusion est différente de celle de Comte et al. (2007) qui interprétaient la présence majoritaire d'un seul pic (fraction) comme une « contamination » de l'échantillon par l'EDTA.

## *Chapitre A-3 : Méthodes de caractérisation de la MEC*

---

La MEC est formée d'une fraction organique et d'une fraction minérale. Dans cette synthèse, nous avons particulièrement ciblé l'étude de la MEC à travers sa fraction protéique puisque ces molécules, semblent indispensables à la structure du biofilm. Nous avons voulu développer et valider des méthodes novatrices dans le domaine des biofilms issus de boues épuratoires. Des méthodes concernant la caractérisation de la nature et de la masse moléculaire des PEC, des protéines et des substances humiques-like ont été mises en œuvre. Nous avons aussi analysé la fraction minérale de la MEC issue de boue activée. Cette étude suit les travaux menés au laboratoire par D'Abzac et al. (2010) sur les boues granulaires.

## **1. Outils de caractérisation de la fraction organique de la MEC**

### **1.1. Dosage des protéines (et des substances humiques-like) par colorimétrie**

La quantification classique des protéines repose sur des dosages colorimétriques. Des réactifs chimiques interagissent avec des groupements chimiques caractéristiques de l'espèce à doser. L'intensité de la couleur générée est lue par spectrophotométrie UV/ visible. Les résultats dépendent d'une référence (albumine de sérum bovin pour les protéines) peu représentative de la complexité de la MEC (Dignac et al., 1998).

Différentes méthodes ont été proposées dans la littérature pour le dosage des protéines (Tableau A10). Chaque méthode a ses désavantages, la démarche consiste donc à faire évoluer les méthodes déjà existantes en les adaptant au milieu complexe qu'est une boue. Ainsi Raunjker et al. (1994), concluent que la méthode de Lowry est la plus adaptée aux eaux usées susceptibles de contenir une fraction non négligeable de protéines comptant moins de 8 liaisons peptidiques (invalide la méthode Bradford) et une fraction importante de sucre (invalide la méthode BCA).

Tableau A.10 : Les différentes méthodes de dosage colorimétrique des protéines.

<b>Méthode</b>	<b>avantages</b>	<b>inconvénients</b>
Lowry et al., 1951 Réaction au Biuret et Folin- Ciocalteu	-détecte des composés contenant au moins 2 liaisons peptidiques → même réponse colorée quelque soit le type de protéine (Raunjker et al., 1994) -pas d'interférence avec les sucres (Raunjker et al., 1994)	-interférences avec les substances humiques (Frølund et al., 1996), les sulfites (Box, 1983), le fer, les lipides et les détergents (Peterson, 1979) → surestimation de la quantité de protéines
Bradford et al., 1976 Réaction au Bleu de Coomassie	-pas d'interférence avec d'autres composés organiques	-interférences avec les détergents -détecte des composés contenant au moins 8 liaisons peptidiques et en particulier riches en arginine → réaction colorimétrique beaucoup plus forte avec l'utilisation de la protéine étalon de référence, l'albumine de sérum bovin (BSA) (Davis, 1988) → réactions colorimétriques différentes en fonction du type de protéine → Sous estimation de la concentration en protéine (Raunjker et al., 1994)
Acide Bicinchonique (BCA) Smith et al., 1985 Réaction du Biuret et BCA	-bonne sensibilité	-sensible aux sucres (Raunjker et al., 1994) -réaction colorimétrique différentes en fonction du type de protéine (Ras et al., 2008)

L'interférence liée à la présence des substances humiques-like a conduit à améliorer la méthode de Lowry : la méthode de Lowry modifiée (Frølund et al., 1996) prend en compte la présence des substances humiques-like. Le dosage quantifie l'ensemble [protéines et substances humiques-like] et les substances humiques-like. La quantité « réelle » de protéine est donc déduite. La méthode de Lowry modifiée est celle actuellement retenue pour le dosage des protéines dans les eaux usées.

Cependant cette technique génère une concentration en substance humique-like même en leur absence et sous estime la concentration en protéines (Avella et al., 2010b). Les auteurs préconisent de ne pas utiliser cette méthode pour des échantillons très dilués (< 0,25 mg de protéine /L).

De plus, Smith et al. (1985) ont mis en évidence l'interférence de certains composés chimiques susceptibles de modifier la sensibilité de la méthode (Tableau A11).

Tableau A.11 : Influence de composés chimiques sur le dosage des protéines par la méthode de Lowry (Smith et al., 1985).

Interfèrent	Intensité du signal par rapport à la référence (BSA dans l'eau) en %
NaOH 0.1N	+2
EDTA 2%	-92%
Triton 1%	précipité
Tris 0.1M	-22%
Sulfate d'ammonium 20%	précipité
Glucose 0.018g/L	+4%
Glucose 18g/L	+40%

Ainsi la présence d'EDTA dans la MEC extraite par la méthode EDTA (Comte et al., 2006) est susceptible de sous estimer la concentration en protéine. Dès lors, l'étude de l'évolution des protéines sur la MEC extraite par EDTA est susceptible d'être erronée (car non sensible). D'Abzac et al. (2010a) mettent en évidence la concentration en protéine la plus faible comparée à 8 autres méthodes d'extraction sur des boues granulaires anaérobies, Comte et al. (2006a) ne peuvent donner un résultat cohérent pour la MEC extraite par EDTA des boues activées.

## **1.2. Utilisation de la fluorescence 3 dimensions pour la caractérisation des protéines-like et des substances humiques-like**

La spectrofluorimétrie 3 dimensions (3D) permet d'obtenir des matrices 3 dimensions d'excitation et d'émission de fluorescence (EEM). Les applications de cet outil d'analyse sensible et spécifique sont en pleine évolution. D'abord utilisé pour caractériser la matière organique dissoute d'eau naturelle (Senesi, 1990 ; Mayer et al., 1999), Henderson et al. (2009) montrent que les matrices fluorescence 3D sont un outil potentiel de contrôle des eaux recyclées. En effet, la technique est rapide et facile à mettre en œuvre (pas de préparation d'échantillon préalable). Cet outil a été développé pour la caractérisation de la MEC extraite des boues (Esparza-Soto et Westerhoff, 2001 ; Sheng et Yu., 2006). Chen et al. (2003) ont

défini dans leurs travaux une carte des zones où se trouvent les différents composés organiques tels que les protéines-like, les substances humiques-like,... (Figure A14).

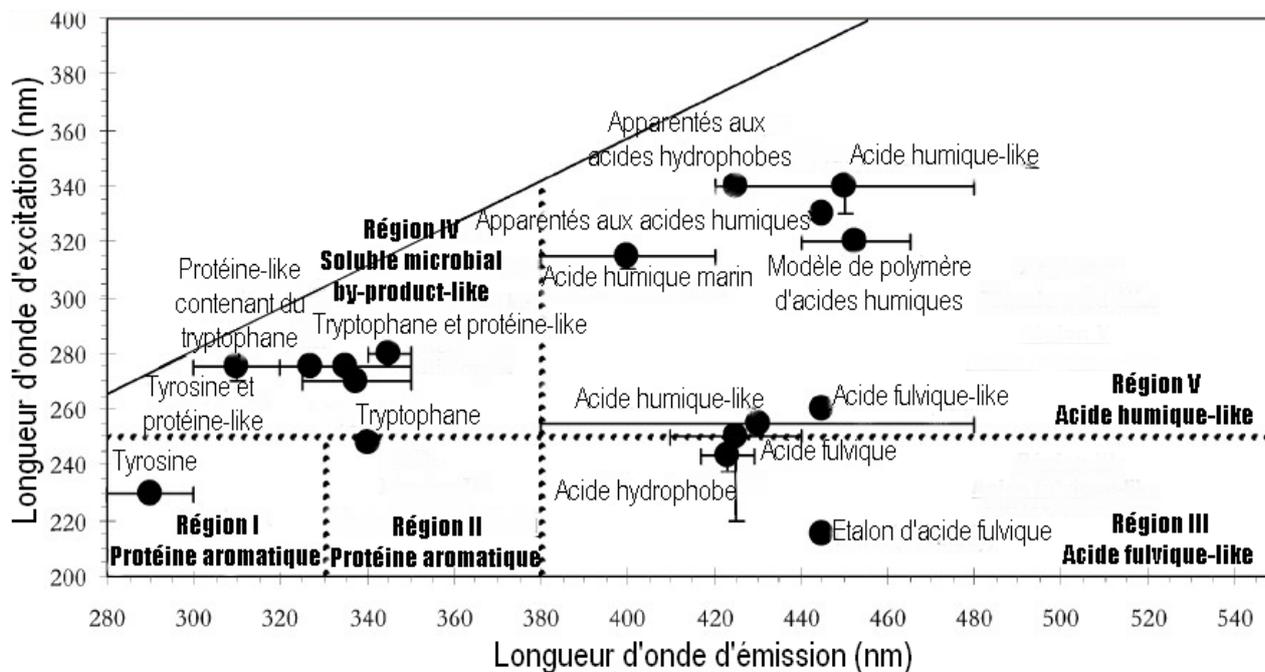


Figure A.13 : Localisation de certains composés organiques en matrice de fluorescence 3D : 5 régions définies (Chen et al., 2003).

Ainsi les protéines-like (Emission < 380 nm) sont décrites dans trois régions :

- région IV : (Excitation > 250 nm) : « soluble microbial by-product-like » sont les espèces associées à des composés dérivant des protéines et contenant les acides aminés comme le tryptophane ou la tyrosine (liés ou libres),
- région I (Excitation/Emission : 250/< 330nm) : fluorescence des protéines associée à la présence de tyrosine (libre ou liée),
- région II (Excitation/ Emission : < 250/330 nm) : fluorescence des protéines associée à la présence de tyrosine (libre ou liée),

Les substances humiques-like (Emission > 380 nm) sont décrites dans deux régions :

- région III (Excitation < 250 nm) : fluorescence des acides fulviques-like,
- région V (Excitation < 250 nm) : fluorescence des acides humiques-like.

Les acides aminés libres, tyrosine et tryptophane émettent à de plus courtes longueur d'onde que ces mêmes acides aminés intégrés aux protéines en raison de leur liaison avec les protéines (Determann et al., 1994). Les régions tyrosines et tryptophanes sont parfois difficiles à discerner en raison de leur superposition. Les protéines montrent une fluorescence dominée par le tryptophane.

La variation de localisation des maxima d'émission fluorescente peut être attribuée à une différence de la composition chimique de la matière organique pour les matières organiques dissoutes (Senesi, 1990) ou pour les PEC (Liu et al., 2011). Ainsi Senesi (1990) a observé que les substances humiques issues de milieu d'eau douce (lacs, rivières) émettent à de plus grandes longueurs d'ondes que celle d'échantillon marin. Les déplacements des maxima de fluorescence dans une région donnée est donc une source d'informations résultant d'une différence de la structure chimique de l'échantillon. Ces signatures de fluorescence de protéine-like et de substance humique-like peuvent ainsi potentiellement être impactées par l'origine des boues biologiques (Tableau A15) ou bien par leur métabolisme. Ainsi Coble (1996) montre que la décomposition de macromolécules se traduit par un déplacement des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission vers les petites longueurs d'ondes (« blue-shift »).

Figure A.14 : Localisation des maxima de fluorescence des protéines-like , des « soluble microbial by product-like » et des substances humiques-like de MEC issus de différents types de boue.

Echantillon de MEC : origine et extraction		Région IV « Soluble microbial by product-like » Ex/Em (nm)	Région I et II Protéines-likes Ex/Em (nm)	Région III et V Substance humique-like Ex/Em (nm)
Granule aérobie Adav et Lee, 2011	Centrifugation	270/335	220/330	330/420
Boue activée de BRM Liu et al., 2011	Chaleur (100°C -1h)	270-280/300-310 275-285/300-310	225/300 225/350	340/435 325/435
Boue activée Sheng et Yu, 2006	Résine	280/343	225/340	340/428

Il est donc facile de caractériser les différentes fractions (liées fortement et faiblement, solubles) des PEC par des matrices 3D de fluorescence (Yao et al., 2012). Par ailleurs, ces techniques permettent aussi de suivre l'évolution au cours du temps :

- de la mise en place d'un biofilm (Zhang et al., 2010),
- de la stabilité de granules (Xu et al., 2010),
- de la matière organique, située dans les différents compartiments d'un bioréacteur à membrane (Liu et al., 2011).

Cependant la signification de certaines régions reste encore à développer. Ainsi, Mayer et al. (1999) associent à la fluorescence de la tyrosine la présence d'un matériel organique relativement plus dégradé qu'une fluorescence associée au tryptophane. Liu et al. (2011) montrent au contraire, que la fluorescence associée à la tyrosine est spécifiquement issue d'une synthèse active des microorganismes des boues activées puisque son signal augmente au cours du temps après mise en route du bioréacteur.

Par ailleurs, la méthode est quantitative puisque l'intensité du maxima de fluorescence est proportionnelle avec la concentration massique de la MEC. Il faut néanmoins prendre en compte les effets de matrice (Henderson et al., 2009) susceptibles de modifier l'intensité des maxima de fluorescence d'une région étudiée. Les interférences peuvent provenir de différents facteurs :

- concentration de la MEC supérieure à 25 mg/L;
- variation de 1% de signal par degré °C;
- variation de 0 à 30% du signal pour une variation de pH de 6 à 8 ;
- extinction de fluorescence provoquée par l'interaction avec les ions métalliques ou avec la matière organique;
- modification du signal provoquée par oxydation (UV, ozone).

### **1.3. Méthode de séparation des PEC en fonction de la taille**

Une autre approche de la caractérisation des PEC est d'étudier leur masse moléculaire. Outre une approche fondamentale, l'étude des masses moléculaires (MM) des PEC pourrait s'appliquer à l'optimisation des procédés des bioréacteurs. Horan et Eccles (1986) décrivent que les PEC de hautes MM sont associés à une forte densité du floc et à une forme arrondie du floc. Goodwin et Foster, (1985) ont montré qu'une décantation déficiente des boues activées était liée à la présence de molécules de faibles MM, ces résultats sont confirmés par Garnier et al. (2005). La littérature décrit différentes méthodes de séparation des PEC en fonction de leur masse moléculaire telles que la CES (Frølund and Kieding, 1994), l'électrophorèse SDS-PAGE (Park et al., 2008) et la Séparation/Fractionnement par

Flux/Force avec Flux Asymétrique (AFFF) (Alasonati et Slaveykova, 2011). Chaque méthode de séparation est associée à une ou plusieurs méthodes de détection qui est directement couplée à la détection (hors SDS-PAGE) ou qui est appliquée après récupération des fractions.

### ***1.3.1. Chromatographie d'exclusion stérique haute performance***

#### **1.3.1.1. La séparation des molécules**

En CES, la séparation est réalisée avec une colonne qui contient une phase stationnaire composée de gel de silice (ou de polymères) qui crée un réseau de pores au sein de la colonne. Les molécules circulent au sein de ce réseau poreux et sont séparées en fonction de leur taille. Les molécules ayant des dimensions supérieures au diamètre moyen des pores seront les premières éluées, les molécules dont la taille est largement inférieure à celle des pores seront éluées en dernier. Entre ces deux extrêmes, se situe la gamme d'élution sélective de la colonne.

Cependant, des interactions entre la phase stationnaire et les molécules existent, il est dès lors approximatif d'établir une correspondance réelle entre le volume d'élution et la taille des molécules. Specht et al. (2000) proposent de faire des études systématiques sur les interactions présentes. Ainsi, Frølund et Kieding (1994) ; Görner et al. (2003) ; Garnier et al. (2005) ; Simon et al. (2009) et Villain et al. (2010) décrivent la présence d'interactions ioniques et /ou hydrophobes. Ceci se traduit par des molécules éluées bien après le volume de perméation total de la colonne. Comte et al. (2007) ; Simon et al. (2009) ; Villain et al. (2010), ont tenté soit d'éliminer les interactions ioniques en augmentant la force ionique de la phase mobile, soit d'éliminer les interactions hydrophobes en ajoutant à la phase mobile un solvant organique (acétonitrile, méthanol). Au final, et sauf interférence de la phase mobile avec le mode de détection (Garnier et al., 2005), la phase mobile constructeur est celle qui est utilisée, mais la notion de masse apparente commence à se généraliser dans la littérature.

Par ailleurs, les PEC sont un mélange complexe contenant différentes classes de molécules organiques avec leur spécificité chimique et leurs formes propres. Au sein même d'une classe de molécule, différentes conformations existent. Ainsi une protéine globulaire (enzyme) peut avoir la même masse moléculaire qu'une protéine fibreuse (collagène), mais leur volume hydrodynamique sera différent. Le choix d'une molécule étalon est donc à réfléchir puisque

l'étalonnage de la colonne est fait en fonction du logarithme de la masse moléculaire. Par ailleurs, des interactions peuvent intervenir entre la colonne et les étalons. Différents types d'étalon sont utilisés : polymère de polyéthylène glycol (Wang et al., 2009), polymère de dextrane et pulluane (Frølund et Kieding., 1994), protéine (Comte et al., 2007), sulfonate de polystyrène (Alasonati et Slaveykova, 2012). Les sulfonates de polystyrène ont été surtout développés pour l'étude des substances humiques de la matière organique dissoute des eaux naturelles (O'Loughlin et Chin., 2001). Les protéines sont majoritairement utilisées comme référence mais de nombreux auteurs appliquent des étalons polysaccharidiques et protéiques (Görner et al., 2003 ; Garnier et al., 2005 ; Ni et al., 2009). L'étalonnage de la colonne avec les protéines et les polysaccharides n'est pas identique (Garnier et al., 2006). Ainsi, Avella et al. (2010a) trouvent dans leur étude que pour un volume d'élution  $V$ , la MM de l'étalon protéique correspond au triple de la valeur de la MM de l'étalon polysaccharidique (Colonne Zorbax GF-250 Agilent, phase mobile 0.2 M NaCl). Frølund et Kieding (1994) considèrent que la relation entre masse moléculaire et volume d'élution est très approximative au regard de la complexité des échantillons de PEC. Dès lors, l'analyse de chromatogrammes en CES se basera sur la comparaison des empreintes des PEC et non sur la détermination de leur MM (Frølund et Kieding, 1994).

La CES est utilisée pour la caractérisation des PEC issus de boue activée de bioréacteur à membrane, peu de travaux sont répertoriés sur les PEC issus de granules. La CES permet de suivre l'évolution des MM dans un bioréacteur. Ainsi Garnier et al., 2006 ont suivi une croissance bactérienne, Avella et al., (2010a) ont étudié l'impact au cours du temps du cyclophosphamide (un antibiotique) sur les PEC. La détermination des MM des PEC impliqués dans l'encrassement des membranes de bioréacteur à membrane en partie dû aux PEC, est un sujet d'actualité (Wang et al., 2009). Quelques études sont consacrées à l'impact de la méthode d'extraction sur le profil massique des PEC issus *i*) de boues activées (Frølund et al., 1994 ; Comte et al., 2007 ; Ras et al., 2011 ; Dominguez et al., 2010b), *ii*) de granules (Adav et Lee, 2011 ; Caudan, 2012). L'impact des méthodes d'extraction sur les empreintes CES est aussi constaté (Comte et al., 2007; Ras et al., 2011). La caractérisation des PEC issus de 5 boues activées réalisée par Garnier et al. (2005), a permis de créer une première base de données sur la taille des PEC (10kDa < protéines < 600kDa ; polysaccharides < 1kDa). Villain et al., (2010) montrent qu'une variation du nombre de pics détectés est impactée par la nature du biofilm, ou un dysfonctionnement du bioréacteur à boues activées.

### **1.3.1.2. Méthode de détection de la fraction protéique et substances humiques-like après une séparation CES**

La détection couplée est en général réalisée par spectrophotométrie UV-visible à longueur d'onde fixe ou à barrette de diode et par un réfractomètre. La longueur d'onde UV est majoritairement présentée à 280 nm, que les auteurs attribuent à une détection des protéines. La détection au réfractomètre est attribuée à la détection des sucres (Garnier et al., 2006 ; Ni et al., 2009). L'absorbance UV à 280 nm détecte le caractère conjugué des molécules retrouvées dans les protéines, substances humiques-likes et acides nucléiques, il est donc abusif de corrélérer directement le signal à 280 nm aux protéines. La réfractométrie est une technique qui vise à déterminer l'indice de réfraction de la solution, cette technique n'est pas spécifique d'une molécule. Des auteurs mesurent aussi le signal d'absorbance à 210 nm qui est attribué à la détection *i*) des sucres (Tao et Zang, 2008 ; Meisen et al., 2008) *ii*) des molécules organiques sans spécificité (Simon et al., 2009) ou *iii*) des molécules aliphatiques (Görner et al., 2003). Quelques substances minérales peuvent aussi être détectées à 210 nm (Clark, 1999). L'absorbance à 254 nm est réservée aux molécules ayant un caractère aromatique (Ni et al., 2009 ; Her et al., 2003). Mais une protéine peut compter des acides aminés aromatiques (ayant donc un caractère conjugué) et des acides aminés aliphatiques. Le bilan est que la lecture en ligne par réfractométrie ou absorbance UV n'est pas indiquée pour suivre l'évolution d'une classe de molécule particulière mais pour suivre l'évolution des masses molaires de l'ensemble des molécules des PEC, chaque molécule ayant un coefficient d'impact sur le signal plus ou moins élevé. Il vaut mieux parler de signature des masses moléculaires ayant un caractère aromatique pour des absorbance comprise entre 254 et 280 nm. Ainsi, le signal détecté est quasiment le même entre 260 et 280 nm (Comte et al., 2007) ou entre 254 et 280 nm (Tsai et al., 2008). La présence d'une détection à 210 nm couplée *i*) à une absence de détection à 280 nm et *ii*) à la présence de manière organique dissoute (détecté par un DOC (détecteur de carbone organique)) permet d'avancer la présence de molécules aliphatiques telles que les sucres (Tsai et al., 2008).

La spectrométrie infrarouge est utilisée pour l'identification des molécules des fractions mais cette détection est expérimentalement plus complexe puisqu'il faut collecter les fractions, et concentrer l'échantillon plusieurs fois sur une lame afin que le signal infrarouge soit suffisamment sensible (Görner et al., 2003 ; Garnier et al., 2005 ; Avella et al., 2010a). Görner et al., (2003) révèlent ainsi une association forte entre protéine et polysaccharide dans les PEC

de boues activées. Garnier et al., (2005) identifient six familles de molécules dans les PEC (protéines, polysaccharides, lipides, acides organiques et une phase minérale).

Plus facile à mettre en œuvre et plus récemment développée, l'analyse des fractions par des matrices de fluorescence 3D (Tsai et al., 2008 ; Ni et al., 2009 ; Adav et Lee, 2011) permet de mettre en évidence des protéines-like et / ou des substances humiques-like dans les PEC issus de boues activées ou de boues granulaires aérobies.

Her et al. (2003) ont utilisé une CES couplée à plusieurs détecteurs : fluorimètre, UV et COTmètre pour la caractérisation de matière organique dissoute. Un tel système permet de détecter en ligne les protéines-like et substances fulviques-like. La détection étant paramétrée avec des couples Ex/Em spécifiques et définis par une analyse de matrice fluorescente 3D réalisée en amont sur les échantillons. La présence de carbone organique dissous associée à une absorbance faible à 254 nm permet de détecter en ligne les polysaccharides-like.

### ***1.3.2. Electrophorèse de la fraction protéique***

L'électrophorèse est une autre méthode de séparation basée sur la migration différentielle des molécules chargées soumises à une différence de potentiel. Cette technique reste un peu marginale pour l'étude des PEC des boues. Dans la littérature, le SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate-électrophorèse en gel de polyacrylamide) est appliqué pour l'étude de la fraction protéique des boues selon Laemmli (1970). Cette méthode implique de travailler sur des protéines dénaturées monomériques (rupture des ponts S-S, élimination des interactions hydrophobes, ioniques, Van der Waals des protéines natives). Le SDS lié aux protéines confère à celles-ci une charge négative relative identique pour chaque protéine. La migration vers le pôle positif dépend donc du volume hydrodynamique, c'est-à-dire la masse moléculaire des protéines dénaturées. Pour l'étalonnage, des mélanges commerciaux de marqueurs de MM sont utilisés. L'analyse de la gamme de MM (entre 10-20 et 100-200 kDa en général) dépend du % du mélange acrylamide/polyacrylamide choisi pour la confection du gel.

Park et al. (2008) réalisent un prétraitement sur la fraction protéique avant dépôt sur gel : une précipitation séquentielle avec du sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse. La majorité des auteurs n'effectuent pas cette étape.

La révélation des protéines sur le gel est réalisée de manière classique par coloration au bleu de Coomassie (Park et al., 2008 ; Zhang et al., 2007) ou au nitrate d'argent (Martinez et al., 2004). Des méthodes de détection plus spécifiques à l'identification de la fraction protéique des PEC sont aussi appliquées après séparation et purification des bandes protéiques issues du gel d'électrophorèse. Ainsi, Park et al. (2008) ; Huang et al. (2012) identifient les protéines recueillies par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Les spectres résultant sont comparés à une base de données pour l'identification.

Une des applications de cette technique d'analyse est la caractérisation de la fraction protéique de la matière organique présente dans les membranes des bioréacteurs à membrane (Huang et al., 2012), dans ce cas le SDS-PAGE est surtout une étape de préparation pour le choix d'une protéine à analyser.

Le SDS-PAGE est aussi utilisé directement comme outil d'analyse. Ainsi, Park et al. (2008) décrivent l'impact de différentes méthodes d'extraction sur le profil de distribution des MM des protéines dénaturées. Zhang et al. (2007) suivent l'évolution des profils SDS-PAGE au cours de la granulation aérobie.

Park et al. (2008) ont identifié des protéines d'origine bactérienne et humaine dans les PEC issus de boues activées.

## **2. Outils de caractérisation de la fraction minérale de la MEC**

L'étude de la fraction minérale est réalisée par des outils assez classiques tels que l'analyse élémentaire par ICP-MS et ICP-AES après minéralisation. Des méthodes appliquées habituellement sur la matière organique sont aussi utilisées : analyse de groupes fonctionnels par infrarouge, analyse *in situ* par microscopie électronique à balayage/ microsonde de dispersion aux rayons X. L'analyse infrarouge de la matière minérale n'a jamais été menée dans la littérature sur la fraction minérale de la MEC issue de boue. Très peu d'études l'ont décrite sur des fractions minérales de MEC issues de biofilms d'eau naturelle. L'analyse *in situ* en microscopie électronique à balayage est néanmoins un peu plus documentée dans la littérature.

## **2.1. Analyse de groupes chimiques fonctionnels par spectrométrie d'adsorption infrarouge (IR)**

L'application classique de la spectrométrie IR se cantonne souvent à la chimie organique, or Lecomte, dès 1958, avait décrit son intérêt pour les substances organiques et inorganiques. Cette méthode permet de « voir » les mouvements (vibration par exemple) des atomes les uns par rapport aux autres, la fréquence dépendant de la masse des atomes et de la longueur des liaisons. Par ailleurs, cette technique permet de distinguer les variétés allotropiques d'un même composé chimique. Par exemple Le carbonate de calcium  $\text{CaCO}_3$  donne des bandes d'absorption différentes selon qu'il est sous forme amorphe et très hydraté, ou plus classiquement sous forme de calcite ou d'aragonite (Nyquist et Kagel, 1971). Schématiquement, les groupements  $\text{CO}_3$ ,  $\text{SO}_4$ ,  $\text{SiO}_4$  apparaissent de  $1550$  à  $600 \text{ cm}^{-1}$ , les oxydes et oxyhydroxydes métalliques entre  $600$  et  $200 \text{ cm}^{-1}$ . Ces divers produits sont mesurables, soit directement (après séchage à  $60^\circ\text{C}$ ) par une absorbance caractéristique, soit en comparant les absorbances avant et après calcination de l'échantillon, la matière organique étant ainsi éliminée. Par ailleurs Husson et al. (2010), soulignent la possibilité d'avoir une approche quantitative à condition de pouvoir mesurer les quantités de matière prélevées. En effet les absorbances sont additives. Garnier et al. (2005) ont décrit des produits minéraux en couplant un détecteur IR avec une séparation par CES, les échantillons extraits n'avaient pas été calcinés en amont.

Hui et al. (2008) montrent que beaucoup de biofilms formés en eaux naturelles ou industrielles contiennent une forte proportion de substances inorganiques (carbonates, silicates, oxydes en général). Husson et al. (2010) ont analysé un biofilm sur tuyau en eau potable et ont décrit de la calcite ainsi que des aluminosilicates et/ou phosphates. Pour ces deux études, les auteurs ont directement calciné à  $550^\circ\text{C}$  le biofilm. Garnier et al. (2005) ont décrit de la kaolinite, un phyllosilicate, ou encore des phases carbonates associées avec des protéines, des sucres, des sels d'acides organiques. La CES/IR est un outil pertinent, il permet entre autre de donner des informations quand à l'association des phases minérales et organiques si l'extrait de départ n'est pas calciné. Cependant l'absence de calcination peut diminuer la sensibilité de détection des produits minéraux (masqués par l'importance de la matière organique). De plus, en CES, les échantillons sont filtrés à  $0,22 \mu\text{m}$  avant l'injection dans la colonne. Ainsi, des phases minérales, dont le volume hydrodynamique est supérieur à

0,22  $\mu\text{m}$  sont exclues des particules minérales analysées (ou association mineral/ organique). D'Abzac et al. (2010b) ont mis en évidence des particules minérales solides de taille supérieure à 2  $\mu\text{m}$

## **2.2. Analyse micro morphologique *in situ* par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une microsonde de dispersion aux rayons X**

De nombreux outils particulièrement adaptés à l'étude *in situ* des PEC au sein des boues sont actuellement appliqués. La microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à une microsonde de dispersion aux rayons X (DRX) est une approche qui permet une analyse morphologique des particules minérales. La microsonde de dispersion aux rayons X permet de décrire la composition élémentaire des particules minérales observées.

Ainsi l'étude *in situ* par MEB/DRX a permis de mettre en évidence et de caractériser une fraction minérale associée à la fraction organique dans les biofilms :

- L'évolution globale des éléments Si, Fe et Ca sur la zone d'échantillon visualisée peut être suivie sur des biofilms soumis à des concentrations exogènes variables en Fe (Julien, 2011).
- Des métaux associés aux colloïdes ont été décrits dans des biofilms contenant des bactéries issues de sédiments d'un lac pollué (Jackson et al., 1999).
- Des grains plus ou moins denses aux électrons, de taille comprise entre 10 et 100 nm et situées à l'extérieur et à l'intérieur des bactéries sont observés au sein des flocs de boues activées (Leppard et al., 2003).
- Des « particules denses aux électrons » sont aussi détectées dans les fibres de la matrice du floc (Bura et al., 1998). Des particules minérales solides (> 2  $\mu\text{m}$ ) sont observées sur des biofilms d'eau potable sur tuyau (Julien et al., 2011) ou sur les flocs (Guibaud et al., 2009).
- Enfin, D'Abzac et al. (2010b), identifient des particules minérales (entre 10 et 40  $\mu\text{m}$ ) directement sur la MEC extraite de granules anaérobies.

Ainsi l'analyse sur la MEC extraite facilite sûrement le repérage visuel de particule minérale. Les auteurs, selon le protocole de Guibaud et al. (2009), ont par ailleurs concentré par

filtration 0,22  $\mu\text{m}$  la fraction de la MEC, en MEC particulaire (la majeure fraction des colloïdes et la fraction soluble est éliminée). La phase minérale soluble est éliminée du filtre par un rinçage abondant à l'eau ultrapure. La sensibilité de détection est augmentée si on compare à un protocole plus classique où le biofilm est mis à sécher sur une lame de verre (Julien, 2011).

## *Conclusion de l'étude bibliographique*

---

L'étude bibliographique concernant la matrice extracellulaire issue de biofilm épuratoire permet de souligner différents thèmes.

- ❖ Les biomasses épuratoires s'organisent, selon des conditions environnementales en structures distinctes telles que les granules, les flocs ou les biofilms. La stabilité de ces deux structures repose néanmoins sur les mêmes principes impliquant fortement la MEC. Les protéines, peu représentées dans les biofilms issus de souches pures peuvent être largement majoritaires dans les boues granulaires et très présentes dans les boues activées. Il semblerait que les sucres interviennent dans les premières étapes de l'agrégation cellule/cellule mais que la stabilité s'appuie majoritairement ensuite sur les protéines. Au final les protéines et les sucres concourent à la stabilité de l'agrégat. Les protéines de part leurs nombreuses fonctions chimiques impliquent des interactions variées avec les composés de l'agrégat, il nous est donc apparu pertinent de développer des outils dédiés à leurs études.
  
- ❖ La fraction minérale qui est « la fraction cachée » de la MEC, est essentielle à sa stabilité grâce à l'apport de cations divalents libres qui interagissent avec les PEC (protéine en particulier et sucres). Le point bibliographique a permis de comprendre que la quantité de cations divalents potentiellement mobilisables par les PEC est la résultante d'un équilibre entre leur forme ionique ou précipité. Les microparticules minérales mises en évidence au laboratoire (D'Abzac et al. 2010b) seraient susceptibles d'être impliquées dans la stabilité à long terme du granule anaérobie. Afin de poursuivre ces travaux, l'analyse de la fraction minérale de la MEC issue de flocs sera étudiée.
  
- ❖ L'étude de la MEC exige d'abord son extraction. Nous avons montré qu'une méthode d'extraction idéale n'existe pas et qu'il faut au contraire penser aux travaux envisagés pour choisir la méthode d'extraction adaptée à la classe de molécules de la MEC étudiées par exemple. Par ailleurs, une méthode d'extraction n'est pas neutre vis-à-vis des molécules des PEC, la littérature ne prend pas forcément en compte ce biais, ce qui pourrait induire de fausses interprétations. Nous avons voulu expliquer l'impact de la méthode sur l'altération/modification des profils de la masse moléculaire des PEC.

## Conclusion de l'étude bibliographique

---

Nous avons aussi analysé l'impact de la méthode d'extraction sur la fraction minérale de la MEC.

- ❖ Enfin, l'ensemble de ces travaux a permis, transversalement de développer des outils d'analyse pour les substances humiques-like qui, comme la fraction minérale, sont des molécules de la MEC peu caractérisées.

## **Partie B : Matériels et méthodes**

## ***Chapitre B-1 : Appareillages et produits***

---

Avant de présenter les méthodes expérimentales, la liste des différents appareils et produits utilisés seront répertoriés dans cette partie.

## 1. Appareillages

Le tableau B1 répertorie l'origine des différents matériels utilisés.

Tableau B.1: Origine des différents matériels utilisés.

Manipulation	Appareil utilisé
Extraction de la matrice extracellulaire issue des boues	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Sonication : Sonopuls 70 avec sonde M73, Bandelin</li> <li>✓ Chauffage : bain thermostaté Labo-therm SW-200, Resona Technics Co.</li> <li>✓ Centrifugation : centrifugeuse KR 22i, Jouan</li> </ul>
Poids sec et poids sec volatil	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Etuve RO-8, Metrawatt</li> <li>✓ Four, Firlabo</li> </ul>
Carbone organique total	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ COT-mètre Phoenix 8000, Dohrman</li> </ul>
Minéralisation	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Microonde V3000, Anton Paar</li> </ul>
Spectre Infrarouge	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Spectromètre infrarouge Spectrum 1000 IR, Perkin-Elmer</li> </ul>
Microscopie électronique à balayage couplée à une détection aux rayons X	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Microscope électronique à balayage couplé à un détecteur de rayons X XL 30, Philips</li> </ul>
Dosage colorimétrique biochimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Spectrophotomètre CADAS 50S, Dr Lange</li> </ul>
Chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection UV-visible et fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Chromatographe Hitashi LA Chrom, Merck composé des modules suivants : <ul style="list-style-type: none"> <li>Injecteur automatique L7200 avec boucle de 100 µL</li> <li>Pompe haute pression L7100</li> <li>Interface L700</li> <li>Détecteur UV/ visible à barrette de Diode L7455</li> <li>Détecteur fluorescence L7485</li> </ul> </li> <li>✓ Colonnes superdex peptide 10/300 GL et superdex 200 10/300 GL, Amersham Biosciences</li> <li>✓ Colonne bio SEC 100A, Agilent</li> <li>✓ Filtre seringue HPLC 13 mm 0,2µm Spartan</li> </ul>
Spectrofluorimétrie 3 dimensions	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Spectrofluorimètre 3D RF-5301 PC, Shimadzu</li> <li>✓ Logiciel d'acquisition: Panorama Fluorescence 2.1</li> </ul>
Electrophorèse	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cuve : mini-PROTEAN tetra system, Bio-RAD</li> <li>✓ Générateur : GD61, Sebia</li> </ul>
Western blot	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Membrane Nitrocellulose : membrane P/N 6648J, PAIL Biotrace</li> <li>✓ Générateur : EV202, Consort</li> <li>✓ Cuve : Hoefler</li> </ul>

## 2. Produits

La liste ci-dessous reprend la pureté et l'origine des produits chimiques utilisés dans ce travail :

– Acétaldéhyde :	99,5% Riedel-de Haën
– Acide acétique:	100% Prolabo
– Acide acétique :	100 % Prolabo
– Acide chlorhydrique :	37 % Prolabo
– Acide chlorhydrique 1N :	normadose Prolabo
– Acide glucuronique :	99 % Aldrich
– Acide nitrique :	69 % Prolabo
– Acide périodique:	>99% Sigma
– Acide sulfurique :	98 % Prolabo
– Acrylamide :	99% Sigma
– ADN de thymus de veau: 10 mg.mL <sup>-1</sup> :	Adrich
– Ammonium Persulfate (APS) :	98 % Sigma
– Azide de sodium:	99% Prolabo
– Bêta Mercaptoéthanol:	Prolabo
– Bleu Alcian:	Sigma
– Bleu de bromophénol :	Sigma
– Bromure de potassium : pureté pour analyse infrarouge :	Prolabo
– Chlorure de sodium:	99.5% Fisherscientific
– Coloration à l'Argent: PageSilver Silver Staining” :	kit Fermentas
– Coloration au Bleu de Coomassie: PageBlue Protein Staining Solution”	Kit Fermentas
– Cytochrom C de coeur de cheval:	>95% Biochemika
– Dihydrogénophosphate de sodium:	98,5% Prolabo
– Diphénylamine :	98 % Fluka
– EDTA :	99 % Prolabo
– Ethanol :	>99,5 % Sigma
– Ethanol :	96 % Elvetec

## Chapitre B-1 : Appareillage et produits

---

– Ferritine de cheval :	> 99% Sigma
– Formaldéhyde :	36,5 % Prolabo
– Glucagon:	Sigma
– Glucose :	99 % Prolabo
– Glutatardéhyde :	25% Aldrich
– Glycerol:	99% Sigma
– Glycine:	99% Sigma
– Méthanol:	99% Elvetec
– Hydrogénophosphate de disodium:	98 % Prolabo
– Hydroxyde de soude :	99 % Prolabo
– Immunoglobulin G de sérum humain (IgG) :	>95% Sigma
– Insuline de pancreas porcin :	Fluka
– Lait en poudre écrémé :	Régilait
– Lectine Concavaline A biotinylée :	Sigma
– Lectine de Lycopersicon esculentum biotinylée :	Sigma
– Métabisulfite de sodium :	>95% Fluka
– Métahydroxydiphényl :	90% Aldrich
– <i>N,N'</i> -Methylene bis(acrylamide):	99% Sigma
– Nitrate de potassium :	99,99 % Fluka
– Nitrate de sodium :	99% Fluka
– Ovalbumin :	> 98% Sigma
– Peroxyde d'hydrogène :	30 % Prolabo
– Phénol :	99 % Prolabo
– polymères de sulphonate de polystyrène 210, 1400, 43000,13000 Da	Fluka
– Réactif de Folin-Ciocalteu :	2N Fluka
– Réactif de Schiff (Chlorhydrate de pararosaniline à 1 % et métabisulfite de sodium à 4 % dans de l'acidechlorhydrique, 0,25 M) :	Sigma
– Résine échangeuse de cations : Dowex, 20-50 mesh, Na <sup>+</sup> form :	Sigma Aldrich
– Ribonuclease A de pancréas bovin : >70 unités/mg de protéine :	Sigma
– Sérum d'albumine bovine :	98 % Sigma
– Sodium dodécyl sulfate (SDS) :	100% Merck
– Substances humiques :	96 % Aldrich
– Sulfate de cuivre II :	99 % Prolabo

## Chapitre B-1 : Appareillage et produits

---

– Tartrate double de Sodium et de potassium :	99 % Prolabo
– Tétraborate de sodium :	99% Prolabo
– Tetramethylethylenediamine (TEMED) :	100% Sigma
– Thyrotropin releasing hormone (TRH):	> 98% Sigma,
– Tris(hydroxymethyl)aminomethane:	99.85% Acrosorganics
– Tween-20:	Sigma
– Tyrosine-L:	>99% Fluka

## ***Chapitre B-2 : Méthodes***

---

## **1. Origine de la matrice extracellulaire (MEC)**

Le laboratoire dispose d'une banque de matrices extracellulaires déjà extraites de boues prélevées au niveau de différents sites de traitement des eaux usées domestiques ou industrielles. Au cours de nos travaux, nous avons travaillé sur des PEC issus de deux nouvelles boues (AS Lisa et GS Sm).

### **1.1. Origine des boues**

Les matrices extracellulaires proviennent de boue ayant des formes variées : granulaires ou floculées (tableau B2).

Les boues granulaires sont originaires de réacteurs biologiques anaérobies traitant des effluents industriels ou synthétiques et produisant du biogaz. Les boues floculées aérobies sont échantillonnées dans les bassin d'aération à boues activées de stations d'épuration (STEP) traitant principalement des effluents domestiques à l'exception de la boue AS-F qui est issue d'un pilote de laboratoire alimenté avec un effluent synthétique.

Une fois prélevées, les boues sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation (l'extraction de la matrice extracellulaire est réalisée au plus tard après 24h pour les boues activées, au plus tard après 48h pour les boues granulaires). Les boues anaérobies sont immergées dans de l'eau afin d'éviter le contact avec l'air.

Pour l'extraction de la matrice extracellulaire, les granules anaérobies sont rincées deux fois à l'eau ultra pure pour une concentration massique finale de 150 g/L de MS environ. Les boues activées ont été concentrées par 4 cycles de centrifugation (vitesse : 4000 g ; durée : 10 min, à 4°C) avant l'extraction, ce qui conduit à des concentrations de 10 à 15 g /L de MS.

Tableau B.2: Origine des boues utilisées.

Désignation	Type de réacteur	Type d'effluent traité
Boues activées		
AS Am <sup>a</sup>	STEP	95% domestique 5% industriel
AS Liso <sup>a</sup>	STEP	90% domestique 10% industriel
AS Lisa	STEP	90% domestique 10% industriel
AS F <sup>b</sup>	Bassin d'aération d'un pilote sous aéré	Synthétique (Viandox)
Boues granulaires anaérobies		
GS Ee <sup>c</sup>	UASB	Papeterie
GS Em <sup>c</sup>	UASB	Synthétique : SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> et éthanol
GS Ne <sup>c</sup>	EGSB	Distillerie (éthanol)
GS Sm	UASB	Cartonnerie
Boues flocculées anaérobies		
S Re <sup>c</sup>	Digesteur anaérobie	Vinasses de Cognac

AS : “activated sludge”; GS : “granular sludge”; STEP: station d'épuration; UASB: réacteur “up-flow anaerobic sludge blanket”; EGSB: réacteur “expanded granular sludge bed”

<sup>a</sup>Comte et al., (2006a); <sup>b</sup>Guibaud et al., (2004); <sup>c</sup>D'Abzac et al., (2010a)

## 1.2. Méthode d'extraction de la matrice extracellulaire à partir des boues

La bibliographie propose de nombreuses méthodes d'extraction, jusqu'à 10 méthodes (tableau B3) ont été utilisées au laboratoire. Des méthodes physiques dont une méthode de « contrôle » et des méthodes chimiques ont été réalisées pour chaque boue (tableau 3). L'extraction

« contrôle » utilise uniquement la centrifugation, cette étape est commune à toutes les méthodes d'extraction : elle est réalisée après application d'un mode d'extraction spécifique afin de séparer les cellules (présentes dans le culot) de la matrice extracellulaire (présente dans le surnageant). Cette méthode « contrôle » permet opérationnellement de définir la matrice extracellulaire faiblement liée ou LB (« Loosely Bound ») alors que les méthodes chimiques ou physiques associées à la centrifugation permettent de libérer en plus la matrice extracellulaire liée ou TB (« Tightly Bound »).

Tableau B.3: Les différentes méthodes d'extraction des matrices extracellulaires à partir des boues.

Désignation	Protocole	Référence
Méthode d'extraction physique		
Centrifugation*	Centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C	Liu et Fang, 2002b
Sonication	Sonication de 37 W, 1 min, à 4°C pour 50 mL de boue ...puis centrifugation*	Dignal et al., 1998
Résine échangeuse de cations (REC)	La REC est ajoutée à la boue (70g de REC par g poids sec volatil de boue granulaire). Le mélange REC/boue est agité à 600 tr/min, 1h, à 4°C avec un agitateur orbital. ... puis centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C	Liu et Fang, 2002b Frølund et al., 1996
Sonication + REC	Après sonication (37 W, 1 min, 4°C), la boue est agitée en présence de la REC (600 tr/min, 1h, 4°C). ....puis centrifugation*	Dignal et al., 1998
Chauffage	Chauffage en bain-marie 10 min, à 80°C ... puis centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C	Zhang et al., 1999

Méthode d'extraction chimique		
Formaldéhyde + chauffage	<p>Le mélange formaldéhyde/boue (formaldehyde 36,5% (<math>4 \cdot 10^{-4}</math> V / 1 V boue), est stocké 1h à 4 °C.</p> <p>Le mélange est ensuite chauffé au bain-marie (10 min, 80°C)</p> <p>...puis centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C</p>	Fang et Jia, 1996
Formaldéhyde + NaOH	<p>Le mélange formaldéhyde/boue (<math>4 \cdot 10^{-4}</math> V de formaldehyde (36,5%) / 1 V de boue), est stocké 1h à 4 °C.</p> <p>NaOH est ensuite ajouté au mélange (0,4 V de NaOH (1M) / 1 V de boue) puis agité modérément avec un barreau aimanté 3h à 4°C.</p> <p>...puis centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C</p>	Liu et Fang, 2002b
Glutaraldéhyde	<p>Le mélange glutaraldéhyde/boue (0,4 V de glutaraldéhyde (10%)/ 1 V de boue) est agité modérément avec un barreau aimanté 12 h à 4°C.</p> <p>...puis centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C</p>	Azeredo et al., 1998
Acide éthylène diaminetétraacétique (EDTA)	<p>Le mélange EDTA (1 V d'EDTA (<math>20 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}</math>)/ 1 V de boue est agité modérément avec un barreau aimanté 3h à 4 °C.</p> <p>...puis centrifugation à 20 000 g, 20 min, à 4°C</p>	Liu et Fang, 2002b
Ethanol	<p>Centrifugation de la boue (20 000 g, 20 min, 4°C)</p> <p>Le mélange surnageant de la boue/ éthanol 99,5% (3V d'éthanol/ 1V de surnageant de boue) est stocké un nuit à 4°C.</p> <p>Le précipité est enfin récupéré par centrifugation à 4000 g, 15 min, à 4°C</p>	Rätto et al., 2006

Les matrices extracellulaires extraites (MEC) sont ensuite aliquotées et conservées à -20 °C.

La « MECthèque » utilisée pendant l'étude est présentée dans le tableau B4.

Tableau B.4: Banque de matrices extracellulaires utilisée pendant l'étude (x correspond aux extraits de MEC disponibles).

Méthodes d'extraction	AS Lisa	AS Liso	AS Am	AS F	GS Ee	GS Em	GS Ne	GS Sm	S Re
Centrifugation	x	x	x		x	x	x	x	x
Sonication		x	x		x		x		x
REC	x	x	x		x	x	x	x	x
Sonication +REC		x	x	x	x		x		x
Température	x	x	x		x	x	x	x	x
Formaldéhyde + température					x	x	x		x
Formaldéhyde + NaOH		x	x		x		x		x
Glutaraldéhyde		x	x						
EDTA	x	x	x		x		x	x	x
Ethanol					x		x		x

## 2. Caractérisation classique des boues et de la matrice extracellulaire

### 2.1. Détermination du poids sec et du poids sec volatil

La masse sèche (MS) des échantillons est mesurée après un séchage de 24h à 105°C.

La masse volatile sèche (MVS) est déterminée après avoir mesuré la masse minérale (MM) ;

Ainsi  $MVS = MS - MM$

La masse minérale (MM) est mesurée après une calcination à 550°C pendant 2h.

## **2.2. Détermination de la quantité de carbone organique total (COT)**

Le COT-mètre permet de mesurer la teneur en carbone organique total des PEC. Les mesures sont réalisées en triplica.

## **3. Méthode d'analyse de la matrice extracellulaire**

Les techniques d'analyses sont appliquées plus spécifiquement pour la caractérisation de la partie minérale ou à la partie organique de la matrice extracellulaire des boues.

### **3.1. Analyse de la matière minérale**

#### ***3.1.1. Teneur en composés minéraux***

Avant l'analyse des éléments minéraux, les échantillons doivent être minéralisés.

La minéralisation se passe en deux temps : une minéralisation à froid permettant une prédigestion chimique avec dégazage et puis une minéralisation à chaud. L'échantillon de boue (1 mL) ou de MEC (3 mL) est incubé à température ambiante avec 1 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Ensuite, 4 mL d'eau régale (composée de 3 mL d'acide nitrique (69%) et 1 mL d'acide chlorhydrique (37%)) sont ajoutés. Après 24h d'incubation à température ambiante, l'échantillon peut être minéralisé à chaud. Cette dernière étape de minéralisation est un traitement aux microondes à 1 400 W, pendant 20 min (5 min pour atteindre la puissance de 1 400 W, 20 min pour le refroidissement de l'échantillon).

Les échantillons ainsi minéralisés sont ajustés à 50 mL avec de l'eau ultra pure puis filtrés à 0,22 µm (filtre seringue en nitrate de cellulose).

Soixante-douze éléments (Ag, Al, As, Au, B, Ba, Be, Bi, Br, Ca, Cd, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Ga, Gd, Ge, Hf, Hg, Ho, In, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nb, Nd, Ni, P, Pb, Pd, Pr, Pt, Rb, Re, Rh, Ru, S, Sb, Sc, Se, Si, Sm, Sn, Sr, Ta, Tb, Te, Th, Ti, Tl, Tm, U, V, W, Y, Yb, Zn, Zr) ont été dosés dans les échantillons minéralisés. L'analyse a été réalisée par le laboratoire ACME (Analytical Laboratories Ltd (Vancouver, Canada), par ICP-MS

(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) ou ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry).

### ***3.1.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier***

L'analyse infrarouge est classiquement utilisée pour la mise en évidence de groupements fonctionnels sur la matière organique. En comparant les spectres infrarouges des échantillons séchés à 65°C, pendant 24h, à ceux obtenus à partir des mêmes échantillons calcinés à 550°C, pendant 3h, les groupements fonctionnels d'espèce minérale peuvent être caractérisés (Hui et al., 2010) en plus de ceux de la fraction organique.

Les spectres Infrarouges sont mesurés avec une résolution de 4 cm<sup>-1</sup> sur des nombres d'onde variant de 4400 à 400 cm<sup>-1</sup> par un spectromètre infrarouge ; un ou plusieurs signaux de transmittance (bande) sont la signature d'un groupe fonctionnel.

La préparation des échantillons (séchés ou calcinés) consiste à fabriquer une pastille très fine et homogène qui sera ensuite analysée. A cet effet, environ 1 mg d'échantillon est broyé avec environ 180 mg de KBr. Le mélange est ensuite placé 10 min sous presse pour la confection de la pastille.

### ***3.1.3. Microscopie à balayage couplée à un détecteur au rayon X***

L'analyse microscopique électronique à balayage couplée à une microsonde à rayons X, permet d'identifier et de visualiser des composés inorganiques solides.

Les échantillons de MEC sont filtrés sur membrane de nitrate de cellulose 0,22 µm. Les filtres sont rincés avec 100 mL d'eau ultra pure afin d'éliminer les composés organiques solubles et les ions solubles susceptibles de former des précipités minéraux lors du séchage des échantillons (D'Abzac et al., 2010b). Les filtres sont ensuite séchés à température ambiante, 1 semaine environ. Le filtre est déposé sur une lame de microscope qui sera recouvert de graphite en vue de l'analyse microscopique électronique.

Le microscope électronique à balayage est équipé d'une microsonde X dispersive en énergie (MEB-DRX : microscope électronique à balayage équipé d'un microsonde X dispersive en énergie) (SErMIEL, Université de Limoges). La microsonde permet de déterminer la composition élémentaire sur les composés observés au microscope.

## 3.2. Analyse de la matière organique

### 3.2.1. Colorimétrie biochimique

La colorimétrie est une méthode classique pour déterminer les teneurs en molécules organiques (protéines, substances humiques-like, glucides, acides uroniques, acides nucléiques) de la MEC. Chaque dosage est réalisé en triplica (tableau B5). Les réactifs utilisés permettent de mettre en évidence une fonction caractéristique de la molécule organique recherchée.

Tableau B.5: Caractéristiques des dosages colorimétriques utilisés pour la détermination de la composition biochimique des matrices extracellulaires.

	Longueur d'onde (nm)	Réactifs	Groupe chimique recherché	Etalon	Gamme de sensibilité du dosage (g/L)	Références
Protéines	650	Réactif de Folin CuSO <sub>4</sub> 0,5 %	Liaison peptidique et phénol	Albumine de sérum bovin	0,04-0,2	Lowry et al., 1951 Frølund et al., 1995
Substances humiques-like	650	Réactif de Folin	Phénol	Acides humiques	0,04-0,2	Frølund et al., 1995
Polysaccharides	492	Phénol 5 % Acide sulfurique 95 %	Ose neutre (avec au moins 5 (H-C-OH)) principalement	Glucose	0,02-0,1	Dubois et al., 1956
Acides uroniques	520	Tétraborate de sodium 12,5 mM Acide sulfurique 95 % meta-hydroxydiphenyl (MHDP) à 0,15%	Acide uronique (avec au moins 5 (H-C-OH)) principalement	Acide glucuronique	0,05-0,5	Blumenkrantz et Asboe, 1973
ADN	600	Diphénylamine 0,6 % Acide sulfurique 95 %	2-desoxyribose	ADN de thymus de veau	0,005-0,05	Burton, 1956

L'application de la méthode de correction de Frølund et al., (1995) permet de déterminer les teneurs en protéine et en substance humique-like, en prenant en compte la surestimation des

quantité de protéines liée à la présence des substances humiques-like. De même, l'application de la méthode de correction de Blumenkrantz et Asboe, (1973) permet de déterminer les teneurs en ose neutre et en acide uronique, en tenant compte de l'interférence des acides uroniques dans le dosage des oses neutres et réciproquement.

### ***3.2.2. Chromatographie d'exclusion stérique (CES) haute pression couplée à une détection UV/ Fluorescence***

La chromatographie liquide d'exclusion stérique (CES) permet de séparer les molécules organiques natives et minérales sous forme de particule de la matrice extracellulaire en fonction de leur taille. Le, ou les détecteurs couplés permettent l'analyse de l'ensemble des molécules sans distinction (détection UV à 210 nm par exemple) ou au contraire d'un groupe de molécules organiques plus spécifiquement (détection en fluorimétrie, Excitation/Emission : 220nm/ 350 nm, pour les protéines-like par exemple).

Le chromatographe est composé d'un injecteur d'échantillons automatique, de pompes haute pression, d'une phase stationnaire comportant une colonne d'exclusion stérique ou deux colonnes en série et de deux détecteurs en série (un détecteur UV-visible à barrette de diode, un détecteur de fluorescence).

La phase mobile est la phase recommandée par le constructeur : NaCl, 150 mM ; tampon phosphate 50 mM ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) ajustée à  $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$  avec NaOH 2M. Avant utilisation, la phase mobile est filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$  avec des filtres en nitrate de cellulose puis dégazée sous vide pendant 20 min.

La calibration de l'ensemble des colonnes CES (Superdex et Agilent) est réalisée par des étalons protéiques (0,1 g/L environ) de masse moléculaire comprises dans l'intervalle 0,2-440 kDa : Ferritine 440 kDa; Immunoglobuline G de sérum humain 155 kDa; Albumine de sérum bovin 69 kDa; Ovalbumine 45 kDa; Ribonucléase a 13,7 kDa; cytochrome C 13 kDa; Glucagon 3,7 kDa : TRH 0,3 kDa et tyrosine 0,18 kDa. Par ailleurs, la colonne CES « Agilent Bio SEC 100 Å » a aussi été étalonnée par quatre polymères de sulfonate de polystyrène de masse molaire comprises entre 0,21 et 13 kDa. Le volume de perméation total est défini par l'injection de  $\text{NaN}_3$  ou  $\text{NaNO}_3$  (0,6 g/L).

Les colonnes CES seules ou en série, ainsi que leur paramètres théoriques et pratiques sont présentés et déterminés dans le tableau B6.

Tableau B.6: Paramètres et calibration des colonnes CES utilisées.

Système CES	Intervalle théorique de séparation (kDa)	Pression maximale autorisée (bar)	Débit (mL/min)	Volume de perméation totale (mL)	Intervalle du domaine d'application du <i>standard</i> (kDa)	Equation de la droite de calibration M : masse moléculaire (kDa) Ve : volume d'éluion (mL) $r^2$ : coefficient de détermination
Superdex 200 10/300GL	10-600	15	0,3 à 0,5	23	<i>Protéine</i> 13-440	$\log(M) = -0,209 (Ve) + 7,721$ $r^2 = 0,99$
Superdex peptide 10/300GL et Superdex 200 10/300GL en série	0,1-7 et 10-600	15	0,3	46	<i>Protéine</i> 0,18-440	$\log(M) = -0,132 (Ve) + 7,692$ $r^2 = 0,99$
Agilent Bio SEC 100 Å	0,1-100	200	1	10	<i>Sulphonate de polystyrène</i> 0.21-13	$\log(M) = -0,208 Ve + 5,247$ $r^2 = 0,99$

La phase mobile est utilisée pour la dilution éventuelle des échantillons (Matrices extracellulaires ou standards). Les échantillons préparés sont filtrés sur membrane de cellulose régénérée (0,22 µm) juste avant l'analyse. Le volume d'injection est de 100 µL (Frølund et al., 1996; Görner et al., 2003; Garnier et al., 2005, 2006; Simon et al., 2009).

### 3.2.3. Matrice d'excitation-émission fluorescence en 3 dimensions (3D)

L'analyse des échantillons par le spectrofluorimètre 3D permet d'obtenir les spectres de fluorescence de composés organiques par un balayage simultané d'une plage spectrale de longueurs d'onde d'excitation (220 à 400 nm ; pas de 5 nm) et d'émission (240 à 550 nm).

Des zones « excitation/émission » correspondent à des groupes fonctionnels et donc à des composés organiques tels que les protéines ou les substances humiques (Chen et al., 2003).

Les échantillons de MEC sont dilués dans de l'eau ultra pure à 50 mg de poids sec par litre. Ils sont ensuite mélangés (V/V) avec la solution de phase mobile à double concentration (tampon phosphate 100 mM pH 7,0 ± 0,1 sans NaCl) utilisée pour la chromatographie d'exclusion. Ils sont filtrés sur membrane de cellulose régénérée (0,22 µm) juste avant l'analyse.

### ***3.2.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide couplée à des colorations biochimiques ou à des techniques immunologiques***

#### **❖ Séparation des protéines par électrophorèse**

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) est dédiée à la séparation des protéines natives (PAGE natif) ou dénaturée (SDS-PAGE). En conditions natives, les protéines sont séparées en fonction de leur taille et de leur charge alors qu'en conditions dénaturantes (traitement thermique et ajout de β mercaptoéthanol et de sodium dodécyl sulfate (SDS)), les charges apportées par le SDS aux protéines induisent une séparation en fonction de leur taille. La migration sur gel se fait entre deux pôles électriques. Dans les conditions de pH basique, les protéines migrent vers le pôle positif. Le gel est divisé en deux parties : le gel de concentration puis le gel de séparation. Le tampon de migration (tris(hydroxyméthyl)aminométhane 25 mM ; glycine 192 mM ; pH 8,3 ajusté avec HCl 2N ; ajout de SDS 0,5% pour le SDS-PAGE) et le gel permettent une circulation des charges.

Le polyacrylamide est composé d'acrylamide (monomère) et de bisacrylamide (agent réticulant) selon un taux g/g de 29/1. Le gel de concentration (5 % de polyacrylamide) pH 6,7 contient du SDS pour le SDS-PAGE. Le gel de séparation, pH 8,8 contient du SDS pour le SDS-PAGE et un % donné de polyacrylamide. Les caractéristiques des PAGE sont présentées dans le tableau B7 ci-dessous. La polymérisation du gel est catalysée par l'ajout d'ammonium persulfate (APS) et de tetraméthylethylènediamine (TEMED).

Les gels (H=8cm L=8,4cm E=0,75mm) sont soumis à un courant constant de 12,5 mA/gel.

Tableau B.7: Caractéristiques des électrophorèses utilisées pour l'étude des protéines de la MEC.

	<b>% polyacrylamide (m/V)</b>	<b>Intervalle théorique de séparation (kDA)</b>	<b>Durée de l'électrophorèse</b>	<b>Référence</b>
Gel de séparation du PAGE natif	10	22- 300	180 min	Davis, 1964
Gel de séparation du SDS PAGE	10	22- 300	30 min	Laemmli, 1970
Gel de séparation du SDS PAGE	12	13- 200	45 min	Laemmli, 1970

La masse moléculaire (M en kDa) est calibrée en fonction de la distance de migration ((**d**) en mm). L'équation de la droite de calibration (A) est définie par un kit de protéines standards (Fermentas) déjà colorées (20 à 120 kDa) ou non colorées (14,4 à 116 kDa).

$$(A) \quad \log(M) = -a \cdot (d) + b$$

La préparation des échantillons dépend du type d'électrophorèse. Pour le SDS PAGE, l'échantillon est d'abord mélangé avec du tampon de charge (tris(hydroxyméthyl)aminométhane 37,5 mM ; SDS 2% ; glycérol 10% ; Bleu de bromophénol 0,1% ;  $\beta$  mercaptoéthanol 1% (V/V)) dans les proportions 2,75V d'échantillon/1V de tampon de charge, puis chauffé à 100°C, 5 min. Pour le PAGE natif, le tampon de charge ne contient ni SDS, ni  $\beta$  mercaptoéthanol, les échantillons ne sont pas non plus dénaturés par la chaleur. De 3 à 25  $\mu$ L des échantillons préparés sont déposés dans les puits du gel de concentration. Ce volume est fonction du poids sec de l'échantillon ainsi que de la sensibilité de la méthode de révélation.

Une fois révélés, les gels et membranes sont ensuite numérisés et analysés par le logiciel GelAnalyzer 2010a.

❖ **Révélation des protéines par coloration biochimique**

Après la séparation des protéines, différentes colorations sont appliquées aux gels. Ces colorations sont spécifiques des protéines, des glycoprotéines, des protéoglycanes ou des protéoglycanes sulfatés (tableau B8). Pour un échantillon identique de matrice extracellulaire la présence de bandes communes entre deux colorations spécifiques des protéines, confirme la présence des protéines. Pour un SDS-PAGE, une révélation commune entre protéine et glycoprotéine par exemple, confirme la présence de glycoprotéine.

Tableau B.8: Coloration biochimique spécifique des PAGE.

Molécule révélée	Coloration du gel	Groupe chimique recherché	Référence/ méthodes
protéines	Nitrate d'argent	Groupe thiol (-SH)	PageSilver Silver Staining kit Fermentas
protéines	Bleu de Coomassie	Acides aminés aromatiques	PageBlue Protein Staining Solution Fermentas
glycoprotéines	PAS (Acide périodique et réactif de Schiff + métabisulfite de sodium)	Ose (avec au moins 3 (H-C-OH))	Fairbanks et al., 1971
protéoglycanes	Bleu alcian pH 2,5 (acide acétique, éthanol)	Groupe $-\text{COO}^-$ des acides uroniques	Moller et al., 2002
protéoglycanes sulfatés	Bleu alcian pH 1 (HCl, éthanol)	Groupe $\text{SO}_3^-$ des oses	Tobisawa et al., 2010

❖ **Révélation des protéines par immunoblotting**

La recherche de motifs glucidiques neutre ou acide par des lectines permettra encore une confirmation de la présence de glycoprotéines (présence de sucres neutres) ou de protéoglycanes (présence de sucres acides). Cette détection est réalisée après transfert sur membranes de nitrocellulose des protéines séparées par SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989).

L'électrotransfert (ou électroblotting) a été réalisé par « western blot » « semi sec ». Ce montage consiste en une cassette où la base est une cathode et le couvercle, l'anode. La

membrane (côté cathode), juste en-dessous du gel, est enfermée dans cette cassette entre 40 feuilles de papier-filtre Whatman imbibées de tampon de transfert (Tris-base 20 mM pH 8,3 ; glycine 150 mM ; méthanol 20% ; SDS 0,01%). La migration des protéines vers la membrane de nitrocellulose dure 1h pour une intensité de 1,2 mA/cm<sup>2</sup>).

Avant le marquage immunologique, et pour éviter une reconnaissance aspécifique, la membrane est incubée 1h à température ambiante dans une solution de saturation (lait écrémé en poudre 5% (m/V) ; et TBS-T : Tween-20 1% ; Tris-HCl 20 mM ; NaCl 500 mM ; pH 7,5).

Le marquage immunologique des protéines sur la membrane de cellulose (ou immunoblotting) est réalisé par des lectines biotinilées : la Concanavaline A et une lectine de haricot sabre. La préparation des lectines et leur spécificité glucidique sont présentées dans le tableau B9. Le tampon de dilution est le tampon de saturation, l'incubation dure 2h. La révélation de la reconnaissance lectine/ motifs glucidiques présents sur les protéines se fait par l'ajout de streptavidine marquée par une enzyme (incubation à 37°C, 1h dans du tampon de saturation) (tableau B8). La streptavidine reconnaît et se lie spécifiquement à la biotine. Avant et après l'ajout de la streptavidine, il faut rincer plusieurs fois (3 fois, 15 min) la membrane avec le tampon TBS-T. La révélation de l'activité enzymatique est réalisée par le NBT/BCIP, kit 1-Step<sup>TM</sup> NBT/BCIP (ThermoScientific).

Tableau B.9: Spécificités glucidiques des lectines et révélation des westerns blot des protéines des matrices extracellulaires séparées par SDS-PAGE.

Glucides recherchés (épitopes)	Sonde	Détection de la sonde
$\alpha$ -D-mannosyl et $\alpha$ -D-glucosyl	Lectine Concanavaline A biotinilée (dilution : 50 <sup>e</sup> )	Phosphatase alcaline conjuguée à la streptavidine (de <i>Streptomyces avidinii</i> )  (dilution: 5000 <sup>e</sup> )
N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine	Lectine biotinilée de <i>Lycopersicon esculentum</i> (dilution : 50 <sup>e</sup> )	

## **Partie C : Résultats**

*Chapitre C-1 : Analyse de l'impact de la méthode  
d'extraction des PEC à partir des boues sur le profil  
massique des PEC*

---

## Introduction

L'étude des PEC issus des boues de traitement des eaux usées, nécessite dans un premier temps leur extraction. Différentes méthodes physiques et chimiques sont proposées dans la littérature. Chaque méthode apporte une spécificité plus ou moins forte concernant la fraction de PEC extraite. La méthode centrifugation est la méthode la moins drastique, elle est considérée comme méthode témoin car elle ne provoque aucune lyse cellulaire et toutes les méthodes d'extraction se terminent *in fine* par cette étape. L'impact de la méthode d'extraction sur la composition organique des PEC est décrit via différentes approches :

- dosage colorimétrique des différentes molécules organiques (Comte et al., 2006a; D'Abzac et al., 2010a)
- analyse des groupes fonctionnels par infrarouge (Comte et al., 2006a; D'Abzac et al., 2010a)
- analyse des empreintes massiques CES (Comte et al., 2007 ; Simon et al., 2009; Dominguez et al., 2010b; Ras et al., 2011; Adav et Lee, 2011).

Quelques auteurs, ont souligné une possible altération des molécules organiques de la MEC à cause de la méthode d'extraction. Cette analyse est possible grâce à des méthodes qualitatives, différentes des dosages colorimétriques classiques. Ainsi les extractants type « aldéhydes » réagiraient avec les groupes amines des PEC (Analyse infrarouge ; Comte et al., 2006a; D'Abzac et al., 2010a). L'extractant « EDTA » modifie l'empreinte CES des PEC avec l'apparition d'un pic de forte intensité (Comte et al., 2007; Ras et al., 2011). Comte et al., (2007) suspectent l'EDTA d'interagir avec la MEC. Adav et Lee. (2011) montrent que la méthode « Formaldéhyde + NaOH + Sonication » induit un déplacement des pics vers les faibles masses moléculaires par rapport à un autre ordre de séquence d'extraction « Sonication + formaldéhyde + NaOH ». Ces mêmes auteurs suspectent la sonication d'altérer les molécules extraites par « formaldéhyde + NaOH ». Ainsi, l'extractant chimique peut toujours être présent dans la MEC et peut être détecté en tant que PEC. L'extractant physique ou chimique peut interagir avec les molécules de la MEC et les modifier/altérer.

Nous avons analysé l'impact des méthodes d'extraction de la MEC issus de différentes boues. Nous avons choisi comme support technique la CES/ 210 nm. Pour optimiser la séparation

Chapitre C-1 : Analyse de l'impact de la méthode d'extraction des PEC à partir des boues sur le profil massique des PEC

---

des PEC, nous avons utilisé deux colonnes CES en série. La longueur d'onde « 210 nm » permet de détecter sans spécificité, toutes les molécules organiques de la MEC.

Pour cette étude, nous disposons d'une « MECthèque » au laboratoire qui compte des PEC :

- issus de boues de formes variées : boue floculante (pour 2 boues activées) ;  
une boue floculante anaérobie; boue granulaire (pour 3 boues anaérobies),
- extraits par différentes méthodes d'extraction physique et chimique.

**Influence of the method used to extract EPS from  
wastewater sludges on their fingerprints obtained by Size  
Exclusion Chromatography.**

BOURVEN I., SIMON S., GUIBAUD G.\*

Université de Limoges, Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (EA 4330),  
Faculté des Sciences et Techniques, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France.

\* corresponding author, gilles.guibaud@unilim.fr

Published in **Environmental Technology** accepted May 2012

DOI: 09593330.2012.692722

## Conclusion

L'analyse des empreintes CES des PEC issus des différentes boues et extraits par des méthodes d'extraction physiques et chimiques a confirmé les points suivants :

-Il existe des interactions entre la colonne et les molécules des PEC puisque l'ensemble des PEC analysés présentent des pics au-delà du volume de perméation total des colonnes de SEC utilisées.

-A partir de PEC extraits des différents types de boue, nous confirmons aussi une tendance générale qui se dégageait chez certains auteurs : l'extraction physique (centrifugation, REC et/ou sonication) ne modifie pas l'empreinte CES, à l'intensité près des pics. L'extraction par la chaleur induit néanmoins des modifications d'empreinte CES. Les extractions chimiques modifient l'empreinte CES (nombre de pics et intensité des pics).

Pour les empreintes obtenues en SEC, afin d'analyser la part de molécules sélectionnées par la méthode d'extraction et celle modifiée par l'extractant, nous avons, de manière originale, comparé deux empreintes CES : les empreintes CES des PEC extraits par centrifugation (l'extraction témoin) et les empreintes CES des PEC témoins traités par la procédure d'extraction physique ou chimique. Nous avons ainsi analysé l'effet de la chaleur, de l'EDTA, du glutaraldéhyde, du formaldéhyde seul ou avec NaOH.

-Concernant l'effet de la chaleur, l'analyse CES montre, pour les PEC issus des boues activées et des boues floculentes anaérobies, une hydrolyse des composés organiques. L'hydrolyse n'est pas mise en évidence pour les PEC issus des boues granulaires. Ces résultats valident par ailleurs le fait que la méthode d'extraction basée sur la chaleur, est adaptée aux granules anaérobies et non aux boues floculantes.

-Le pic majeur détecté après extraction à l'EDTA, est attribué à la présence d'EDTA ou d'EDTA complexé avec un cation divalent, dans les PEC. Par ailleurs, les pics correspondant aux molécules de haut poids moléculaire ont une intensité plus faible ce qui pourrait être attribué à une rupture des liaisons ioniques «  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante » entre les

## Chapitre C-1 : Analyse de l'impact de la méthode d'extraction des PEC à partir des boues sur le profil massique des PEC

molécules organiques, entraînant ainsi une diminution des structures multimériques de haut poids moléculaire.

-Les aldéhydes et surtout le glutaraldéhyde, semblent interagir avec les molécules organiques et induire l'apparition d'un pic de faible poids moléculaire.

-L'effet du NaOH ou du « formaldéhyde + NaOH » sur le PEC témoin montre, comme l'effet température, une hydrolyse des molécules. L'hydrolyse semble néanmoins plus forte sur les PEC extraits par « formaldéhyde + NaOH » que lors du traitement « formaldéhyde + NaOH » sur les PEC témoins. Nous pouvons donc déduire que les PEC extraits par le NaOH sont plus facilement hydrolysables par le NaOH.

Considérant les analyses qualitatives réalisées en SEC, les extractants physiques (hormis la chaleur) ne modifient donc pas les composés extraits. Le mode d'extraction physique semble cependant extraire en quantité plus ou moins grande les composés. L'extraction température semble induire une hydrolyse des PEC issus de boues floculantes et non des boues granulaires. Les extractants ont différents impacts de modification sur les PEC extraits. L'EDTA libre ou complexé peut être détecté dans les empreintes CES. Le glutaraldéhyde interagissant avec la matière organique, peut induire l'apparition d'un nouveau pic. Le NaOH induit une hydrolyse des molécules extraites.

*Chapitre C-2 : Etude de la fraction minérale de la  
MEC issue de boues activées*

---

## Introduction

L'étude de la fraction minérale de la MEC est peu abordée dans la littérature. Pourtant, la fraction minérale participe au processus d'agrégation et à la stabilité de la matrice des boues. Ainsi, les cations divalents (Mg, Ca, Fe) permettent d'établir des ponts ioniques avec les molécules organiques des PEC chargés négativement (groupes  $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3^{2-}$ ) (Higgins et Novak, 1997). La fraction minérale solide serait impliquée dans la stabilité à long terme des granules (Juang et al., 2010) ou dans la sorption des métaux (Comte et al., 2008). Des particules minérales solides ont été mises en évidence au sein de la matrice des granules (précipité de sel de Ca, de sel de Fe (Juang et al., 2010), des microparticules minérales (10 à 100 nm) et des particules minérales ( $> 2 \mu\text{m}$  de diamètre) ont été mise en évidence dans les floccs de boues activées (Leppard et al., 2003 ; Guibaud et al., 2009). Des particules minérales solides entre 10 et 40  $\mu\text{m}$  (contenant les éléments Si, Fe, S, Ca, P,...) ont été détectées directement dans la MEC extraite de granules anaérobis (D'Abzac et al., 2010b). Par ailleurs D'Abzac et al., (2010b) ont étudié l'impact de la méthode d'extraction sur la fraction minérale issue des granules anaérobies et montrent que certaines méthodes modifient la composition minérale élémentaire de la MEC. La fraction minérale de la MEC est plus faible au sein des boues activées qu'au niveau des granules. Nous avons voulu poursuivre les travaux sur la fraction minérale en investissant celle présente dans la MEC des boues activées. Nous disposons ainsi des MEC issues de deux boues activées et extraites par des méthodes physiques et chimiques. Nous avons utilisé les méthodes d'exploration déjà appliquées par d'Abzac et al., (2010b) : analyse de la teneur en éléments minéraux après minéralisation de la MEC, analyse microscopique (MEB-DRX). Par ailleurs nous avons testé l'utilisation de la spectroscopie infrarouge en vue de la mise en évidence et de l'identification de la phase particulaire minérale.

**Characterisation of the mineral fraction in extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludges extracted by eight different methods.**

BOURVEN Isabelle, JOUSSEIN Emmanuel, GUIBAUD Gilles\*

Université de Limoges, Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (EA 4330),  
Faculté des Sciences et Techniques, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France.

\* corresponding author, gilles.guibaud@unilim.fr

Published in **Bioresource Technology** 102, (2011). 7124-7130

## Conclusion

L'analyse de la fraction minérale de la MEC au sein des boues activées permet de donner une répartition des minéraux dans la MEC ainsi que de décrire et identifier certaines particules minérales solides. L'extraction par « centrifugation », qui apporte le moins de modification au milieu et qui n'induit pas de lyse cellulaire est l'extraction témoin.

La fraction minérale de la MEC des boues activées n'est pas du tout négligeable : entre 19 et 26% pour l'extraction témoin. Les éléments majeurs de la fraction minérale de la MEC extraite par centrifugation sont (en teneur masse/masse) S>P>Fe>Ca>K>Na>Mg>Al>Si. La comparaison des spectres infrarouges menée sur la fraction minérale et sur la fraction entière de la MEC a mis en évidence certains groupes fonctionnels minéraux tels que le groupe Si-O et/ou  $\text{PO}_4^{2-}$  ainsi que  $\text{CO}_3^{2-}$ . La présence de calcite est donc fortement soupçonnée. L'analyse par microscopie (MEB-DRX) des MEC extraites par différentes méthodes d'extraction met en évidence des particules minérales solides de 1 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les éléments minéraux des particules solides ont pu être identifiées : Si>Al>Fe>Ca>K>Mg>Na>P. Certains éléments participent donc dans une forme ionique et dans une forme précipitée, à la composition de la MEC. Les composés minéraux particuliers identifiés confirment l'analyse Infrarouge. Ces composés sont principalement le quartz ( $\text{SiO}_2$ ) et des silicate/aluminosilicates, viennent ensuite l'argile, les feldspaths, les carbonates et les oxydes/ oxy-hydroxydes de fer associés ou non avec des éléments traces métalliques.

Cette étude permet aussi de montrer l'impact des différentes méthodes d'extraction sur la fraction minérale et en particulier, d'analyser les modifications induites sur la composition élémentaire de la MEC extraite.

Le pourcentage de fraction minérale extraite dépend de la méthode d'extraction (glutaraldéhyde <<< chaleur < sonication < centrifugation < REC-REC+ sonication-EDTA < Formaldéhyde + NaOH). L'analyse élémentaire permet de mieux comprendre ces résultats et met en évidence l'impact de la méthode d'extraction en termes de modification et de sélectivité des éléments minéraux de la fraction minérale de la MEC. Ainsi certaines méthodes désorganisent la MEC en modifiant la teneur en éléments minéraux : la chaleur en cassant les liaisons faibles induit un relargage des éléments minéraux qui précipitent dans le culot de centrifugation. L'extraction par REC induit des teneurs élevées en Na et faibles en

Ca, Mg, Fe, K. Ce comportement s'explique par l'échange ionique de la REC. L'augmentation du pH (pour l'extraction formaldéhyde + NaOH) induit une précipitation sélective de beaucoup d'éléments minéraux. La présence de certains minéraux s'explique aussi par un apport exogène de l'extractant lui-même : taux élevée de Na pour l'extraction à l'EDTA (EDTA, Na<sub>2</sub>) et pour l'extraction Formaldéhyde + NaOH (NaOH). Les spectres IR sont impactés par la méthode d'extraction. Ainsi, la présence de certaines bandes sont induites par les extractants chimiques présents dans la MEC (NaOH, EDTA). La présence de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> n'est observée que pour les extractions chimiques Formaldéhyde + NaOH et EDTA.

***Chapitre C-3 : Développement d'outils analytiques en vue de l'étude de la fraction protéique et de la fraction humique-like des PEC issus des boues biologiques utilisées dans le traitement des eaux usées***

---

## Introduction

Les deux chapitres précédents ont présenté des travaux qui ont contribué à finaliser des études en cours au laboratoire. Dans la synthèse bibliographique, nous avons particulièrement ciblé l'étude de la MEC à travers sa fraction protéique, puisque ces molécules, aux propriétés et caractéristiques étendues semblent indispensables à la stabilité des biofilms impliqués dans le traitement des eaux usées. Nous avons voulu développer et valider des méthodes novatrices concernant la caractérisation des protéines de la MEC. Ce travail nous a permis en parallèle de développer des méthodes pour l'étude des substances humiques-like. L'application en particulier de l'étude des protéines sera présentée au chapitre suivant (Chapitre C-4).

Dans le premier article de ce chapitre, le développement de nouvelles méthodes concernant l'étude de la fraction des protéines a paru justifiée au vue de la difficulté d'exploiter les résultats concernant la fraction protéique issue de la MEC extraite par l'EDTA. Nous avons souligné que l'extraction à l'EDTA permettait un bon rendement d'extraction de la MEC, une faible lyse des cellules, et un ratio protéine/sucre élevé (Sheng et al., 2005). Toutefois, l'EDTA reste présent dans la MEC malgré une étape de dialyse post extraction (Comte et al., 2006a). L'EDTA induit des interférences dans le dosage des protéines par les méthodes colorimétriques classiques (Comte et al., 2006a; D'Abzac et al., 2010a). Sa forme libre ou complexée est visible en IR et en détection UV (210 ; 280 nm) après séparation par CES (Comte et al., 2006 ; Ras et al., 2011 ; article du chapitre C-I), la présence d'un pic de très forte intensité lié à l'EDTA empêche une description correcte des empreintes CES de la MEC extraite par l'EDTA. Nous avons voulu explorer si l'exploitation de la fraction protéique de la MEC extraite par l'EDTA était possible via une détection par fluorimétrie après séparation en CES. Le choix des couples de longueurs d'ondes excitation /émission (Ex/Em) a été réalisé par un spectrofluorimètre 3D et se base sur l'étude de Chen et al., (2003). Ces auteurs définissent ainsi des zones spécifiques de fluorescence des protéines-like ( $E_m < 380$  nm) et des zones spécifiques de fluorescence des substances humiques-like ( $E_m > 380$  nm). Par ailleurs, la littérature commence à décrire l'électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) comme un moyen de séparation des protéines des PEC dénaturées (Park et al., 2008). La révélation

est le plus souvent faite par coloration des gels au bleu de Coomassie. Nous avons voulu tester cet outil de séparation des protéines en mode natif (PAGE) et dénaturant (SDS-PAGE) sur les PEC. Nous avons testé différents moyens de révélation des protéines afin de caractériser la fraction protéique. Nous avons voulu voir s'il existait un ordre de grandeur massique de correspondance entre les protéines-like séparées en CES et les protéines natives séparées en PAGE. Pour les deux méthodes (CES et électrophorèse), nous avons utilisé des échantillons de MEC extraites par l'EDTA et par centrifugation (extraction témoin) à partir de deux boues activées et de deux boues granulaires.

Le deuxième article de ce chapitre est précisément consacré à la mise au point et l'exploration de la détection des protéines-like et substances humiques-like issues des PEC extraits de différents types de boues. Pour cela deux colonnes CES sont utilisées en parallèle, une colonne « HMW : high molecular weight » spécifique des hauts poids moléculaires (10-600 kDa) et une colonne « LMW : low molecular weight » spécifique des faibles poids moléculaires (0,1-100 kDa). La colonne « HMW » est étalonnée avec des protéines, la colonne « LMW » est étalonnée avec des sulphonates de polystyrène. Les empreintes CES sont détectées en UV à 210 et 280 nm, et en fluorescence pour des couples de longueur d'onde (Ex/Em) choisis après étude de la MEC par spectrofluorimétrie 3D. Nous avons regardé l'apport de la détection par fluorimétrie pour l'analyse des empreintes CES par rapport aux classiques détections UV. Ainsi, l'ensemble des molécules peuvent être détectées par l'absorbance à 210 nm (Avella et al., 2010a; article chapitre C-1) tandis que l'absorbance à 280 nm, généralement utilisée pour la détection des protéines, met en évidence les molécules ayant un caractère conjugué. Pour cette étude nous avons utilisé les MEC extraites par la REC et issues de 3 boues activées, 3 boues granulaires anaérobies et une boue anaérobie floculante. Le système HPLC est couplé à deux détecteurs : barrette de diode et spectrofluorimètre.

## **Qualitative characterization of the protein fraction of Exopolymeric Substances (EPS) extracted with EDTA from sludge**

BOURVEN Isabelle<sup>2</sup>, COSTA Guy<sup>1</sup>, GUIBAUD Gilles<sup>2\*</sup>

<sup>2</sup>Université de Limoges, Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (EA 4330), Faculté des Sciences et Techniques, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France.

<sup>1</sup>Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (EA 1069), Faculté des Sciences et Techniques, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France.

\*corresponding author, gilles.guibaud@unilim.fr

## **Interest of fluorescence detection to determine Proteins and Humic-like substances fingerprints of ExoPolymeric Substances (EPS) from biological sludges performed by Size Exclusion Chromatography (SEC).**

Divya Bhatia<sup>a,b,c</sup>, Isabelle Bourven<sup>a</sup>, François Bordas<sup>a</sup>, Stéphane Simon<sup>a</sup>, Eric D. van Hullebusch<sup>b</sup>, Stéphanie Rossano<sup>b</sup>, Piet N.L. Lens<sup>c</sup>, Gilles Guibaud<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (GRESE) - EA 4330, Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques, 123 Avenue A. Thomas, 87060 Limoges Cedex, France.

<sup>b</sup>Université Paris-Est, Laboratoire Géomatériaux et Environnement, EA 4119, 5 bd Descartes, 77454 Marne la Vallée Cedex 2, France.

<sup>c</sup>Core Pollution Prevention and Control, UNESCO-IHE, Institute for Water Education, PO Box 3015, 2601, DA Delft, The Netherlands.

\* Corresponding author: Prof. Gilles Guibaud

Tel. +33 (0)5 55 45 74 28 Fax +33 (0)5 55 45 72 03

Email: gilles.guibaud@unilim.fr

Projet d'article pour **Bioresource Technology** (Soumis)

## Conclusion

### Article 1

Les matrices de fluorescence 3D réalisées sur les MEC extraites par centrifugation et par EDTA ont permis de dégager 3 couples Ex/Em pour la détection des protéines-like : 221/293 nm, pour la détection des protéines tyrosine-like ; 270/297nm, pour la détection des « soluble microbial by product-like » ; et 221/360 nm, pour la détection des protéines tryptophane-like. Après séparation en CES, le dernier couple 221/360 nm décrit l'empreinte CES la plus pertinente. Ainsi des intensités de fluorescence, plus élevées, sont présentes dans la zone de séparation optimale de la colonne, et des pics de fluorescence d'intensité beaucoup moins forte sont détectés un peu avant et après le volume de perméation total de la colonne. En comparant avec l'extraction témoin, les profils obtenus en fluorescence sont assez similaires (à l'intensité près) et l'EDTA n'est pas détecté contrairement à une détection UV. La méthode permet de différencier les empreintes protéines-like en fonction de l'origine de la boue. La méthode CES/ fluorescence Ex/Em 221/360 nm permet donc d'explorer les empreintes des protéines-like issues de MEC extraites à l'EDTA.

La coloration des protéines sur les gels d'électrophorèse est beaucoup plus sensible avec la révélation au nitrate d'argent qu'avec le bleu de Coomassie. En gel natif, seules les fractions protéiques de la MEC issues des boues granulaires anaérobies, qui ont une quantité de matière sèche dans les extraits de PEC plus élevée que les boues activées, ont pu être détectées. Le profil massique des protéines de l'électrophorèse native est en concordance avec les masses apparentes trouvées en CES/Fluorescence Ex/Em 221/360 nm.

Les profils de protéines dénaturées des SDS-PAGE/nitrate d'argent sont exploitables pour les MEC issues des boues activées ou des boues granulaires anaérobies. Le volume de MEC déposé dans les puits du gel est un paramètre à optimiser en fonction du poids sec de la MEC mais le volume maximum imposé par la technique est de 20 µL. Les profils massiques révélés par la coloration permettent de facilement différencier les MEC selon la boue d'origine.

La coloration au PAS (acide périodique et réactif de Schiff) couplée au SDS-PAGE permet de détecter des glycoprotéines. Cette méthode a permis de révéler la présence de glycoprotéines

dans la fraction protéique de la MEC issue de 3 boues. La MEC issue de la boue granulaire anaérobie traitant des effluents de distillerie, ne présente aucune glycoprotéine visible. Les glycoprotéines se situent vers les hauts poids moléculaires des protéines dénaturées (100 kDa). La MEC issue de la boue granulaire traitant des effluents de papèterie semble particulièrement riche en glycoprotéines.

Le SDS-PAGE/ nitrate d'argent permet donc d'obtenir un profil massique des protéines dénaturées des PEC issus des boues. L'utilisation d'autres révélateurs (PAS) permet de mieux caractériser la nature des protéines dénaturées séparées. Des glycoprotéines sont ainsi détectées dans la MEC des boues activées et dans certaines boues granulaires anaérobies.

## **Article 2**

Les matrices de fluorescence 3D réalisées sur l'ensemble des MEC issues des 7 boues, a permis de mettre en évidence un couple Ex/Em : 221/350 nm, cohérent et commun à chaque MEC et appartenant à la zone de fluorescence des protéines tryptophane-like. Pour les substances humiques-like, une zone de fluorescence est parfois difficilement détectable mais le couple Ex/Em 345/443 nm est exploitable.

La séparation CES de la MEC a été dans un premier temps étudiée sur la colonne proposant la plus large gamme de séparation de poids moléculaire, soit de 10 à 600 kDa (colonne HMW). Cette colonne est étalonnée avec des protéines de MM connues.

Ainsi avec la colonne HMW, les empreintes de la MEC détectées à 210 et 280 nm sont assez similaires, à l'intensité près des pics. Pour la détection des protéines-like par fluorescence, les empreintes CES sont assez similaires à celle détectées à 210 nm mais l'intensité relative de certains pics est beaucoup plus élevée qu'en détection UV. Cette méthode est donc très sensible. Elle démontre, en outre, qu'un pic majeur détecté en UV ne représente pas la majorité des molécules de la MEC puisque en détection fluorescence protéine, plusieurs pics peuvent être d'intensité élevée. Pour les substances humiques-like, une détection n'est possible qu'à partir de volumes proches du volume de perméation total pour la colonne HMW. La colonne LMW est donc plus appropriée.

### Chapitre C-3 : Développement d'outils analytiques en vue de l'étude de la fraction protéique et de la fraction humique-like des PEC issus des boues biologiques utilisées dans le traitement des eaux usées

---

L'étalonnage de la colonne LMW a été réalisé avec des standards de sulphonates de polystyrène classiquement utilisés dans la littérature pour l'étude des substances humiques de la matière organique.

Ainsi, alors que les empreintes CES détectées à 210 ou 280 nm montrent peu de variations de profil, celles détectées en fluorescence « protéine-like » et fluorescence « substance humique-like » montrent des gammes de masses très différentes : très étendues pour les protéines (<10 ; >600 kDa), de faibles poids moléculaires pour les substances humiques-like (1,2 ; < 6 kDa). Ce mode de détection, qui est à exploiter avec une colonne CES adaptée, est un outil sensible et très spécifique. L'empreinte CES/fluorescence permettent, en outre, de mieux différencier la MEC en fonction de son origine : boues granulaires anaérobies ou boues activées. Ainsi, les empreintes CES/ Fluorescence protéine ou substance humique-like sont plus complexes pour les MEC issue des boues granulaires anaérobies.

***Chapitre C-4 : Etude de la fraction protéique des PEC  
issus de boue granulaire anaérobie***

---

## Introduction

L'article 1 du chapitre C-3 a montré qu'il était possible d'étudier la fraction protéique de la MEC issue des boues par SDS-PAGE. Les protéines dénaturées peuvent ainsi être caractérisées en fonction de leur masse moléculaire mais aussi en fonction de leur nature selon le révélateur des gels mis en œuvre. L'article 1 du chapitre C-3, montre ainsi la révélation de glycoprotéines dans la MEC issue de boues activées et de boues granulaires anaérobies. La présence de glycoprotéines dans la MEC de boues activées était très suspectée grâce à l'étude de Park et Novak, (2009). Nous avons souligné que la MEC issue de la boue anaérobie traitant des effluents de papèterie était particulièrement riche en glycoprotéines. Avec la méthode de coloration PAS (Fairbanks et al., 1971), nous avons voulu poursuivre l'exploration des glycoprotéines dans la MEC de deux boues granulaires anaérobies traitant des effluents de papeterie et cartonnerie. L'exploration de la fraction glycoprotéique, nous a amené à mettre en œuvre des colorations spécifiques de la nature des sucres, ainsi que des westerns blots. Nous avons travaillé avec la fraction soluble (extraction centrifugation) et liée (extraction REC) des MEC issues de deux boues granulaires anaérobies.

## **Evidence of glycoproteins and sulfated proteoglycan-like presence in EPS from anaerobic granular sludge: Possible implications for interactions between granular components**

BOURVEN Isabelle<sup>1</sup>, BACHELLERIE Guillaume<sup>2</sup>, GUIBAUD Gilles<sup>1\*</sup>, COSTA Guy<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Université de Limoges, Groupement de Recherche Eau Sol Environnement (EA 4330),  
Faculté des Sciences et Techniques, 123 Av. Albert Thomas, 87 060 Limoges, France.

<sup>2</sup>Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (EA 1069), Faculté  
des Sciences et Techniques, 123 Av. Albert Thomas, 87060 Limoges, France

\*Corresponding author: gilles.guibaud@unilim.fr

Projet d'article pour **Bioresource Technology**

## Conclusion

Pour l'étude des sucres de la fraction protéique de la MEC issue de deux boues granulaires anaérobies, nous avons mis en œuvre après électrophorèse en SDS-PAGE (électrophorèse dénaturante) :

- la coloration au PAS révélant des glycoprotéines,
- la coloration au bleu alcian révélant *i)* à pH 2.5 la présence de sucres acides caractéristiques des protéoglycanes et *ii)* à pH 1, la présence de sucres sulfatés, caractéristiques des protéoglycanes sulfatés (Tobisawa et al., 2010),
- la détection de résidus de sucres spécifiques révélés par des lectines après western blot.

Nous avons confirmé la présence de glycoprotéines (MM des glycoprotéines dénaturées : 120-150 kDa et 28-36 kDa), présentes en quantité moindre par rapport à la fraction protéique révélée au nitrate d'argent (majorité des MM des protéines dénaturées : 20 à 100 kDa et MM > 120 kDa pour une boue granulaire). La présence de résidus de sucre neutres ( $\alpha$  D-mannose et/ou  $\alpha$  D- glucose), a été détecté par la lectine *Con a* sur certaines glycoprotéines (40, 50 et 90 kDa).

Nous avons détecté par la suite une à deux bandes de protéoglycanes-like et de protéoglycanes sulfatés-like particulièrement présents dans la MEC liée. Nous avons donc recherché à mettre en évidence les sucres aminés présents dans les protéoglycanes (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine) grâce à une lectine de tomate (*Lycopersicon esculatum*). Certains protéoglycanes-like contiennent le motif de N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine. Ce motif semble aussi retrouvé pour la MEC d'une boue granulaire sur les glycoprotéines. Enfin, il existe des protéines dénaturées possédant à la fois les motifs de sucre neutre et acide (MM : 68 kDa). Or le N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine peut aussi entrer dans la composition de certaines glycoprotéines (Hart et al., 2007).

Les glycoprotéines et les protéoglycanes-like avec des groupes chargés négativement ( $-\text{COO}^-$  et  $-\text{SO}_4^{2-}$ ) contribuent à l'architecture du biofilm granulaire. Ainsi, au sein de la matrice extracellulaire, les glycoprotéines peuvent établir des liaisons spécifiques avec les lectines (Park et Navak, 2009) et les groupes des protéoglycan-like, chargés négativement peuvent établir des liaisons ioniques avec des cations divalents (Sheng et al., 2010).

## **Partie D : Conclusions et perspectives**

***Chapitre D-1 : Altérations/modifications induites sur  
la MEC par les méthodes d'extraction de la MEC à  
partir de boues biologiques***

---

La MEC (matrice extracellulaire) des boues biologiques est impliquée dans la forme, l'agrégation et la stabilité des boues biologiques (boues activées, boues granulaires anaérobies). La MEC est composée d'une fraction organique (protéines, polysaccharides, substances humiques-like, acides uroniques, et en moindre quantité, lipides et acides nucléiques) et d'une fraction minérale. L'étude de la MEC permettra donc de contribuer à l'optimisation des procédés biologiques de traitement des eaux usées, à travers une meilleure qualité de la boue. Notre travail, de recherche de caractérisation de la MEC des boues, nous a conduit à développer des outils novateurs de caractérisation de la MEC. Une des approches pour l'étude de la MEC nécessite son extraction des boues. Certaines méthodes d'extraction ont été décrites comme vecteurs possibles d'altération de la MEC. Notre premier travail a donc consisté à repérer et analyser l'altération/ modification de la MEC (fraction minérale et organique) induite par différentes méthodes d'extraction.

Nous avons travaillé avec des méthodes d'extraction physiques (sonication, résine échangeuse de cations (REC), chauffage) et chimiques (EDTA, formaldéhyde + NaOH, formaldéhyde + chaleur, glutaraldéhyde, éthanol) couramment utilisées. L'extraction centrifugation, moins drastique, et n'induisant pas de lyse significative des cellules, est considérée comme l'extraction témoin, même si elle ne permet que d'accéder à la fraction faiblement liée des PEC.

La modification des molécules organiques a été mise en évidence, puis étudiée par l'analyse d'empreinte CES (Chromatographie d'exclusion stérique) couplée à une détection UV 210 nm. D'une manière générale, la « MEC témoin » (issue de l'extraction centrifugation) a été comparée à la « MEC témoin ayant subi un traitement d'extraction ». Nous avons travaillé sur la MEC issue de boues granulaires anaérobies et de boues activées.

L'impact de la méthode d'extraction sur la fraction minérale a été mise en évidence par une analyse de la teneur élémentaire après minéralisation des MEC. Par ailleurs, des extractants chimiques ont été calcinés à 550°C, et leur spectre IR (infrarouge), comparés à la MEC extraite par les réactifs chimiques correspondants (calcinée aussi à 550°C). Nous avons travaillé sur la MEC issue de boues activées.

Le Tableau D1 montre les principales méthodes d'extraction impliquées dans la modification de la MEC. Cette analyse est valable pour la MEC issue de boues activées ou de boues

Chapitre D-1 : Altérations/modifications induites sur la MEC par les méthodes d'extraction de la MEC à partir de boues biologiques

granulaires anaérobies. Pour la fraction minérale, nous avons étudié la MEC issue de boues activées mais les résultats présentés sont en accord avec les travaux de D'Abzac et al., (2010b) sur la fraction minérale de la MEC issue de boues granulaires anaérobies.

Tableau D.1: altérations de la fraction organique et minérale de la MEC provoquées par la méthode d'extraction

<b>Extractant chimique ou traitement physique de l'extraction</b>	<b>Effet sur la fraction organique de la MEC</b>	<b>Effet sur la fraction minérale de la MEC</b>
Chaleur	Hydrolyse les molécules/désorganise les complexes multimériques de la MEC issue des granules anaérobies.	Diminution de la teneur des éléments Ca, Mg, K, Fe, P, S et Cu Certains éléments seraient libérés de la matrice désorganisée par la chaleur. L'excès d'ions précipite.
Résine échangeuse de cations (REC)		Modifie le ratio Na/Ca, Mg, Fe, K de la MEC. Les Na issus de la REC sont échangés avec les ions principalement multivalents de la MEC.
EDTA	L'EDTA reste présent dans la matrice sous forme libre ou complexée.	Apport de Na car le produit initial est le sel disodique de l'EDTA Diminution d'une majorité des macroéléments qui seraient piégés par l'EDTA et puis par la boue par sorption des complexes formés, l'ensemble étant éliminé lors de la centrifugation finale
Glutaraldéhyde	Le glutaraldéhyde interagit avec les PEC (liaison covalente).	
Formaldéhyde + NaOH	Le NaOH hydrolyse les molécules/désorganise les complexes multimériques des PEC extraits spécifiquement par cette méthode. Le formaldéhyde interagit avec les PEC (liaison covalente).	Apport de Na par le NaOH Diminution des éléments Ca, Mg, K, P, S, liée à leur précipitation induite par l'augmentation du pH Dissolution de certains précipités de la boue ou des PEC et enrichissement en certains ions comme l'Al.

Ainsi, pour la fraction organique, les extractions physiques « sonication, REC, sonication + REC » ne semblent pas altérer la MEC. La « chaleur » altère les PEC (polymères extracellulaires) issus des boues flocculées (boues activées et boue flocculée anaérobie) mais peut être utilisée pour les PEC issus des boues granulaires anaérobies. Pour la fraction minérale, les extractions « sonication » et « glutaraldéhyde » sont les seules à ne pas apporter, avec l'extractant, des éléments minéraux, et n'induisent pas non plus un relargage ou une rétention ciblée de ces derniers. Les modifications induites par la méthode d'extraction sont à prendre en compte *i)* pour l'étude des propriétés des PEC hors de la matrice, par exemple pour les interactions MEC/ métaux ou MEC/ molécules organiques, *ii)* pour l'étude de l'impact de la méthode d'extraction sur la MEC, mais aussi *iii)* pour la caractérisation de la MEC. Le développement de certaines techniques de caractérisation pour les PEC peut néanmoins permettre d'exploiter les PEC « contaminés » par un extractant ou même altérés.

***Chapitre D-2 : Développement et apport de nouveaux  
outils de caractérisation de la MEC issue des boues  
biologiques***

---

La synthèse bibliographique a mis en avant que l'agrégation des microorganismes et la forme des boues impliquaient fortement la MEC. Afin de mieux comprendre le rôle des PEC et de la fraction minérale de la MEC, nous avons testé des outils de caractérisation de la MEC provenant d'autres domaines.

## 1. Fraction minérale de la MEC

Pour la fraction minérale, nous avons utilisé des techniques déjà mis en œuvre au laboratoire: détermination de la teneur élémentaire après minéralisation, observation et analyse *in situ* par MEB DRX (microscope électronique à balayage équipé d'une microsonde X à dispersion d'énergie). Nous avons testé, par ailleurs, une analyse par spectroscopie infrarouge après calcination de la MEC, comme cela avait été préalablement fait directement sur des biofilms.

Cette étude menée sur la MEC issue de boues activées a confirmé de manière générale, les travaux de D'Abzac et al., (2010b) menés sur la MEC issue de boues granulaires. Ainsi, même si la fraction minérale de la MEC issue des boues activées est inférieure à celle issue des boues granulaires, nous avons montré la présence commune de particules minérales solides de taille comprise entre 1 et 50  $\mu\text{m}$ . La répartition des éléments minéraux dans les particules minérales solides est variable selon le type de boue, mais les éléments Si, Fe, Ca, Mg, P sont communs. Pour la MEC issue des boues activées, les composés minéraux solides sont principalement le quartz ( $\text{SiO}_2$ ) et des silicates ( $\text{SiO}_4$ ) /aluminosilicates et en moindre quantité l'argile, les feldspaths, les carbonates et les oxydes/ oxy-hydroxydes de fer associés ou non avec des éléments traces métalliques. De la kaolinite (un phyllosilicate) ainsi que des phases carbonates associées avec des protéines, sucres et sels d'acides organiques sont aussi décrits dans la MEC issue de boues activées par Garnier et al., (2005). Dans la MEC des granules anaérobies, les composés principalement identifiés étaient la calcite, l'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ ), le sulfure de fer II ( $\text{FeS}$ ), le Fe étant souvent associé à des particules ayant des teneurs élevées en Ca, P et S (D'Abzac et al., 2010b). L'hydroxyapatite et l'oxy-hydroxyde de fer sont aussi décrits dans les granules aérobies par Juang et al., (2010).

Les particules minérales sont associées ou non aux PEC, les oxy-hydroxydes de fer sont communs aux boues activées et granulaires aérobies. La structure particulière minérale de la

MEC des boues activées s'appuie plutôt sur l'élément Si (quartz, kaolinite) alors que celle des granules s'appuie plutôt sur l'élément Ca (calcite, hydroxyapatite).

Les agrégats sont communément étudiés par rapport à leur fraction organique. Au regard des résultats obtenus dans le laboratoire, et des quelques résultats issus de la bibliographie, il semble que chaque agrégat possède une signature propre de la MEC en ce qui concerne les éléments minéraux. Cette signature minérale est fonction de son type, voir de son origine..

## **2. Fraction organique de la MEC**

Nous avons particulièrement développé les méthodes de détection pour deux méthodes de séparation des PEC en fonction de leur MM (masse moléculaire).

La première méthode de séparation, la CES (Chromatographie d'exclusion stérique) est adaptée pour les PEC natifs ou les complexes multimériques (hétero/homomultimères). La gamme de séparation des MM est étendue via l'utilisation de deux colonnes (résolution théorique : 0,1-100 kDa et 10-600 kDa). L'étalonnage de la colonne [10-600 kDa] a été réalisé en utilisant des protéines de MM connues, permettant une caractérisation la plus correcte possible d'une des fractions principales de la MEC, à savoir la fraction protéique. Par contre, la colonne [0,1-100 kDa], séparant les plus faibles poids moléculaires, a été étalonnée avec des standards de sulfonate de polystyrène, ces molécules étant généralement utilisées dans la littérature pour l'évaluation des poids moléculaires des substances humiques de la matière organique dissoute. En effet, la correspondance entre un volume d'élution et une MM n'est qu'indicative car l'étalon choisi n'a pas forcément la même forme que les molécules des PEC. De plus, le matériel composant la phase stationnaire de la colonne n'est pas neutre vis-à-vis des PEC : des interactions de types ioniques et/ou hydrophobes, entre une partie des molécules composant les PEC et la phase stationnaire de la colonne, sont récurrentes. Ainsi, pour cette technique de séparation, nous étudierons principalement les « empreintes CES » des PEC, comme préconisé par Kieding et Frølund (1994) qui sont à l'origine de la caractérisation des PEC par SEC.

La deuxième méthode de séparation, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE), s'est avérée plus adaptée aux MEC de tous les types de boues, en mode dénaturant (SDS-PAGE), qu'en mode natif (PAGE). Ce type de séparation donne donc des informations sur les

monomères de PEC qui constituent éventuellement les complexes multimériques. La gamme de séparation, destinée à la caractérisation des monomères est moins étendue que pour la CES (20-120 kDa). L'étalonnage est réalisé par un kit commercial de protéines.

La CES est généralement couplée à une détection par absorption UV à des longueurs d'onde de 210 ou 280 nm. Nous avons développé une méthode de détection par spectrofluorimétrie pour les MEC issues de boues activées, d'une boue floculée anaérobie et de boues granulaires anaérobies. Les couples Excitation/Emission (Ex/Em) ont été choisis suite à la réalisation de spectres 3-D en spectrofluorimétrie dans les zones Ex/Em spécifiques des macromolécules protéines-like (3 couples possibles) et des substances humiques-like. Pour les extractions à l'EDTA, et à la REC, les couples Ex/Em, 221/360 nm et 221/350 nm ont été respectivement sélectionnés pour la détection des protéines-like. Ces couples correspondent à la détection des « protéines tryptophane-like » et permettent la meilleure sensibilité pour l'obtention d'empreinte de la fraction protéine-like des PEC. La sélection d'un couple commun pour la détection des substances humiques-like à partir des spectres 3-D en spectrofluorimétrie est moins évidente car la fluorescence dans la zone des substances humiques-like peut être masquée par la forte fluorescence des protéines. Néanmoins, le couple Ex/Em 345/443 nm permet l'enregistrement des chromatogrammes quelque soit l'origine des PEC.

La méthode CES/ fluorimétrie protéine-like ou substance humique-like a été comparée aux méthodes classiques de détection CES/ absorbance 210 ou 280 nm.

Les empreintes CES/ 210 nm et 280 nm sont semblables (seule l'intensité des pics varie). La littérature attribue pourtant l'absorbance à 280 nm (détectant le caractère conjugué des molécules) à la détection des protéines principalement, et celle à 210 nm, à l'ensemble des molécules aliphatiques et parfois minérales. Les empreintes CES/ fluorescence protéine-like ressemblent aussi aux empreintes à 210 nm, mais l'intensité des pics composant le chromatogramme est plus élevée mais aussi très différentes pour la gamme de séparation de la colonne (10-600 kDa). Avec la CES/fluorescence protéine-like, plus spécifique que l'absorbance UV à 280 nm, on peut conclure, avec plus de certitude que la gamme de MM des protéines-like reste très étendue : de >600 kDa à <10 kDa. A l'inverse, les empreintes CES/ fluorescence substances humiques-like sont très spécifiques puisque des pics sont détectés à partir des

faibles MM seulement, soit 1,2 à 4,8 kDa. Ainsi, pour la détection des substances humiques-like par CES, il faudra choisir une colonne séparant des poids moléculaires faibles (0,1-100 kDa). Ce travail montre que la fraction de substances humiques-like des PEC est composée de molécules de faibles MM (<5 kDa), Ce qui rejoint les tailles de substances humiques composant la matière organique naturelle des eaux par exemple.

Comparées aux empreintes CES/absorbances UV, les empreintes CES/ fluorescence protéine-like et fluorescence substances humiques-like permettent de mieux différencier les PEC en fonction de leur origine (granules anaérobies ou boues activées). Ainsi, les empreintes des PEC issus de boues granulaires anaérobies sont plus complexes que celles issues des boues activées. Outre sa spécificité de détection (protéine-like ou substance humique-like), la CES fluorescence protéine-like possède un autre avantage. En effet, l'EDTA, qui est présent dans la MEC extraite par la technique utilisant ce composé, et détecté en UV à 210 ou 280 nm par un pic de très forte intensité, n'est pas détecté sur les chromatogrammes obtenus à l'aide d'un détecteur fluorimétrique. Ainsi, nous illustrons ici qu'au choix d'une méthode d'extraction, il faut y adapter une méthode de détection adéquate, si l'on veut caractériser les PEC par leur empreinte SEC.

La coloration des protéines sur les SDS-PAGE est usuellement réalisée par le bleu de Coomassie. Nous avons mis en évidence que la coloration par le nitrate d'argent donnait des résultats similaires au bleu de Coomassie mais avec une sensibilité beaucoup plus importante. La majorité des protéines dénaturées des PEC ont des MM comprises entre 20 et 100 kDa, une boue granulaire présente en plus des protéines dénaturées de MM >120 kDa.

Par ailleurs cette méthode de caractérisation des protéines dénaturées ne détecte pas non plus les altérations/modifications liées au formaldéhyde ou à l'EDTA, ces altérations/modifications étaient visibles en CES/ UV 210 ou 280 nm. La Figure D1 montre les empreintes en SDS-PAGE de protéines dénaturées des PEC issus d'une boue granulaire anaérobie et extraits par différentes méthodes.



Figure D.1: Empreintes SDS-PAGE/ Ag, des protéines des PEC issus d'une boue granulaire anaérobie (GS Ee) et extraits par différentes méthodes.

REC : Résine échangeuse de cations ; Son : Sonication ; T : Chaleur ; EtOH : éthanol; F+T : Formaldéhyde + NaOH. ; M : marqueur de poids moléculaire

La Figure D2 montre que les empreintes CES/ UV 210 nm sont impactées par la méthode d'extraction (en particulier par les méthodes chimiques) alors que les empreintes SDS-PAGE/ Ag présentent un aspect similaire (Figure D1). Cela signifie d'une part que la méthode SDS-PAGE/ Ag ne permet pas de détecter les altérations/modifications (hydrolyse des complexes multimériques) décrites en CES/ 210 nm. Cela signifie d'autre part, que les protéines dénaturées (SDS-PAGE) extraites auraient des profils presque similaires alors que leurs associations en complexe multimériques (CES/ 210 nm) seraient différentes, soit une association variable de monomères. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait faire les profils SDS-PAGE/ Ag sur des MEC issues de plusieurs boues et soumises à différentes méthodes d'extraction et surtout les comparer avec les empreintes CES/ fluorescence protéine-like. Nous avons néanmoins étudié l'impact des extractions par centrifugation seule, et par la REC, dans l'article 2 du chapitre C3. D'une manière générale, les empreintes CES (colonne HMW : 10-600 kDa) ont le même profil, mais on note l'absence d'un pic pour l'extraction par centrifugation seule, pour des volumes d'élution situés entre 8 et 12 mL (Figure D2). De même l'article 1 du chapitre C3 compare les empreintes CES des PEC issus de deux types de boues et extraits selon deux méthodes : centrifugation et EDTA. La différence majeure se

situé de même entre des volumes d'éluion situés entre 8 et 12 mL, avec une absence de signal pour les PEC extraits avec l'EDTA. Ces volumes d'éluion correspondent à des protéines-like de haut poids moléculaires (théoriquement de 150 à 600 kDa) issues vraisemblablement d'un assemblage de protéines monomériques en agrégat.

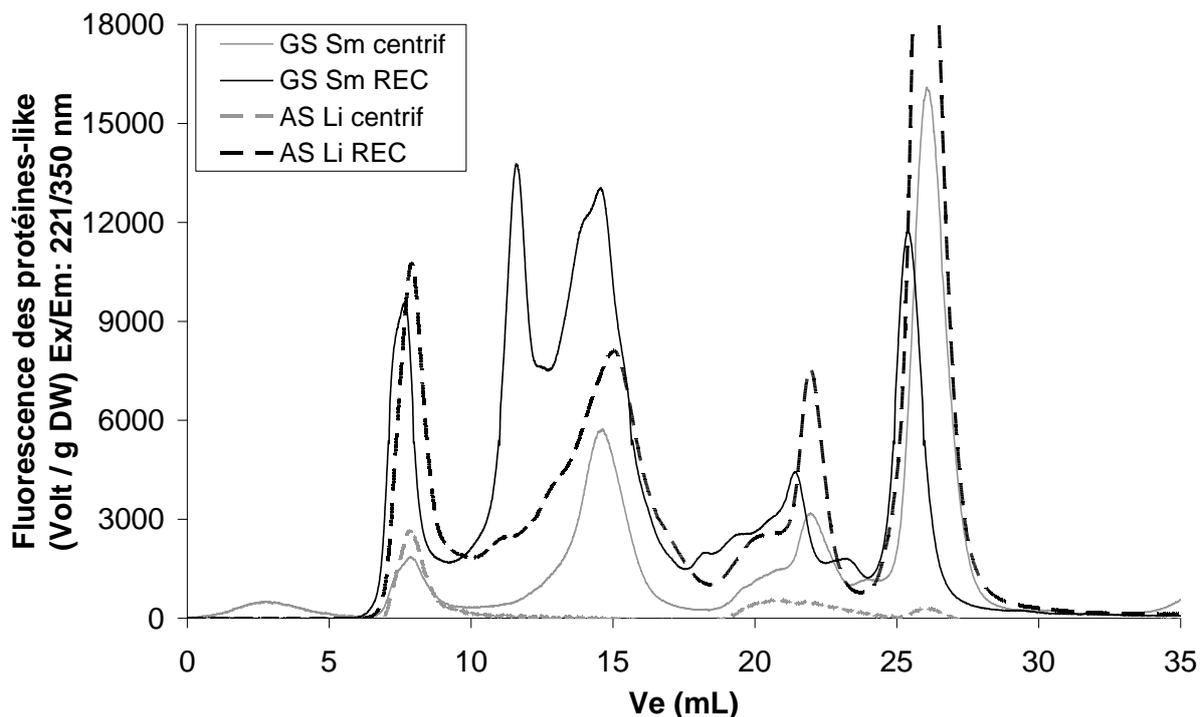


Figure D.2: Impact des méthodes « centrifugation » et « REC » sur les empreintes CES des PEC issus de deux type de boues -colonne Superdex, Amersham Biosciences, 200 10/300 [10-600 kDa]- (article 2 du chapitre C3).

Par ailleurs, en vue d'explorer la fraction protéique dénaturée (séparation en SDS-PAGE), nous avons testé d'autres colorations/ révélations. Nous avons ainsi mis en œuvre des méthodes pour caractériser la partie glucidique des protéines.

### 3. Caractérisation des glucides de la fraction protéique

La détection des glycoprotéines de même que celle des proétoglycanes repose sur deux approches : une méthode de détection « générale » des sucres présents dans chaque type de

protéines, puis la recherche de sucre spécifique principalement présent dans le type de protéine.

Pour la détection des glycoprotéines, l'ensemble des sucres sont visualisés par une coloration PAS après le SDS-PAGE (Fairbanks et al., 1971) ; par ailleurs les sucres neutres des glycoprotéines sont mis en évidence par l'application d'une lectine (spécifique des résidus mannose et/ou glucose) après western blot des protéines séparées en SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989).

Pour la détection des protéoglycanes, les sucres acides et sulfatés sont respectivement visualisés par une coloration au bleu alcian pH 2,5 (Moller et al., 2002) et pH 1 (Tobisawa et al., 2010) après le SDS-PAGE.

Des glycoprotéines ont été détectées dans les PEC issus des boues activées (MM des glycoprotéines dénaturées : 100 kDa) et en particulier dans les PEC issus des boues granulaires anaérobies (MM des glycoprotéines dénaturées : 120-150 kDa et 28-36 kDa). La méthode reste néanmoins peu sensible pour les PEC issus de boues activées.

Nous avons donc poursuivi la caractérisation de la fraction protéique sur les PEC issus de boues ayant la masse sèche la plus élevée : les boues granulaires anaérobies. Nous avons identifié la présence de sucres neutres (glucose et/ou mannose) par une lectine sur certaines des glycoprotéines.

Une à deux bandes correspondant à des protéoglycanes-like et à des protéoglycanes sulfatés-like ont été détectées. Ces bandes sont particulièrement présentes dans la MEC fortement liée des boues granulaires anaérobies. Les protéoglycanes-like contiennent parfois le motif N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine (détecté par une lectine). Ce motif est aussi retrouvé pour la MEC d'une boue granulaire sur les glycoprotéines. Ainsi, le motif N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine confirme la présence de protéoglycanes. Ce motif, qui peut aussi entrer dans la composition de certaines glycoprotéines (Hart et al., 2007), est aussi présent sur certaines protéines identifiées comme glycoprotéines. Enfin, il existe des protéines dénaturées possédant à la fois les motifs de sucre neutre et de sucre aminoacétylé (MM : 68 kDa).

Les lectines sont habituellement utilisées *in situ* sur des boues observées en microscopie confocale à balayage laser pour identifier des composants. Nous avons montré que les lectines peuvent aussi permettre la confirmation de la présence de glycoprotéines / protéoglycane-like, après séparation de la fraction protéique de la MEC par SDS-PAGE.

Les techniques de révélations/détections mises en œuvre après séparation de la fraction protéique de la MEC en SDS-PAGE, nous ont permis de mieux définir la nature de la fraction protéique de la MEC issue des boues granulaires anaérobies. Le paragraphe suivant propose un modèle moléculaire d'interactions à l'intérieur de l'agrégat avec les informations obtenues lors de ce travail et celles disponibles dans la littérature.

*Chapitre D-3 : Vers un modèle moléculaire de la  
matrice des boues granulaires anaérobies*

---

La présence de glycoprotéines et de protéoglycane-like / sulfatés nous a permis de compléter un modèle moléculaire des interactions des PEC au sein de la matrice des boues granulaires anaérobies impliquées dans le traitement des eaux usées et la production de méthane. Ce modèle, basé sur celui de Higgins et Novak, (1997), et de Caudan (2012), met en avant :

- la présence des glycoprotéines liées par les protéines ayant une activité lectine-like (Park et Novak, 2009),
- la présence de cations divalents en interaction avec les sucres acides des protéoglycane et avec les groupes sulfatés présents sur les sucres des protéoglycane.

Nous avons par ailleurs pris en compte que la fraction protéique peut aussi être le support moléculaire des interactions hydrophobes puisque l'hydrophobicité semble plus importante pour la stabilité des boues granulaires anaérobies que pour celle des boues activées. (Guo et al., 2010) (Figure D3).

Le modèle des interactions moléculaires au sein de la matrice du granule proposé Figure D3 se situe au niveau d'une couche mediane externe du granule anaérobie : à ce niveau, les cellules, ainsi que les protéines et carbohydrates de la MEC sont bien représentés (Adav et Lee, 2008; McSwain, 2005). De plus, le centre du granule est plutôt riche en précipité minéraux et pauvre en molécules organiques (Juang et al., 2010) et les feuillettes internes sont pauvres en carbohydrates (Adav et Lee, 2008).

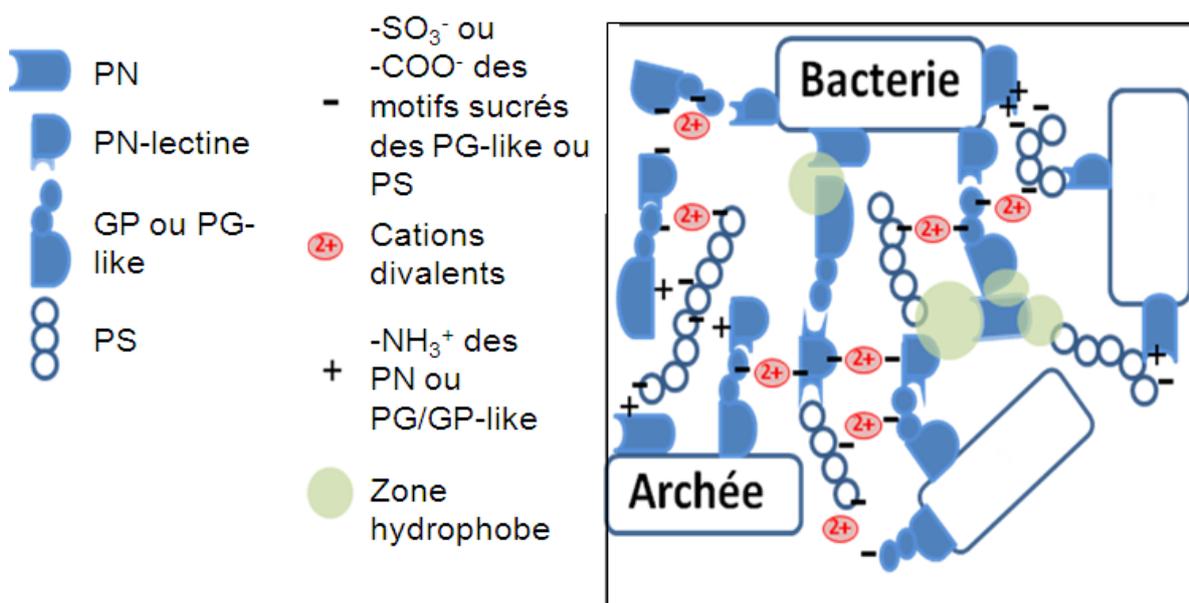


Figure D.3: Modèle des interactions moléculaires possibles entre les PEC issus de boues granulaires anaérobies (adaptation du modèle d'Higgins et Novak, 1997).  
 PN : protéine ; PS : polysaccharide ; PG : protéoglycane ; GP : glycoprotéine

Dans le modèle présenté figure 3, interviennent les PEC et la fraction minérale sous forme d'ions libres ou associés à la matière organique de la MEC, mais au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence une fraction minérale sous forme particulaire. Ainsi, pour donner une vision plus complète de la matrice des boues granulaires anaérobies, il faudrait prendre en compte cette fraction. Nous savons que la fraction minérale particulaire solide joue un rôle dans la stabilité à long terme du granule et qu'elle est principalement localisée au centre de celui-ci pour -éventuellement- des raisons métaboliques (Juang et al., 2010). Toutefois, nous avons montré qu'il existe aussi des particules minérales solides dans les boues activées. La présence de particules minérales solides est, peut être, exacerbée au niveau du centre du granule mais il doit nécessairement exister des sites de nucléation minérale répartis dans l'ensemble de la MEC des granules anaérobies. Ainsi, la matrice extracellulaire osseuse, présente chez les organismes pluricellulaires supérieurs, est constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale (60%). La matrice osseuse organique est composée de microfibrilles de collagène, de protéoglycanes, ainsi que de 3 protéines impliquées dans la minéralisation de la matrice. La phase minérale de la matrice osseuse est constituée de cristaux d'hydroxyapatite et de carbonate de calcium. Ces cristaux sont localisés, soit entre les fibres de collagène soit à l'intérieur de celles-ci. Des ions calcium et phosphates sont situés en surface de ces cristaux et participent à des échanges rapides avec le liquide interstitiel. Le modèle de la matrice osseuse nous donne ainsi un autre rôle possible de la fraction protéique (protéine, protéoglycane-like) puisque celle-ci pourrait être impliquée dans le processus d'organo/minéralisation dans la MEC des boues granulaires anaérobies.

## ***Chapitre D-4 : Perspectives***

---

Ce travail de thèse pourrait se poursuivre par un approfondissement de la caractérisation de la fraction organique et minérale des PEC issus de boues biologiques (boues activées et granules anaérobies).

La caractérisation de la matière organique de la MEC a fait l'objet d'un développement de techniques au laboratoire. Néanmoins, il serait justifié de confirmer les méthodes de détection en CES.

Ainsi, nous avons développé une méthode de détection en CES basée sur la sélection d'un couple Ex/Em spécifique des protéines-like. Il serait pertinent de soumettre les PEC à des enzymes hydrolysant les liaisons peptidiques des protéines puis d'analyser l'impact de ce traitement sur les empreintes CES « protéine-like fluorescence ». Cette digestion permettrait de confirmer la méthode de détection en fluorescence protéine-like en cas d'absence de signal. Il est aussi envisageable de regarder son impact sur les empreintes CES « substances humiques-like fluorescence » et « absorbance 210 nm ».

Ce principe pourrait aussi s'appliquer pour la digestion des sucres toutefois il n'existe pas d'enzyme capable de digérer l'ensemble des liaisons glucidiques, chaque enzyme étant spécifique d'un type de liaison. Néanmoins, après digestion par les protéases, les fractions éluées, correspondant aux pics détectés en absorbance à 210 nm, peuvent être recueillies et analysées par CPG (chromatographie en phase gazeuse) par exemple, ou très simplement, déposées sur une plaque de silice CCM (chromatographique sur couche mince) et soumise à un test biochimique mettant en évidence les glucides (acide sulfurique concentrée à chaud).

Ces manipulations n'exigent pas des méthodes de détection pointues (de type Spectromètre de Masse à temps de vol) et permettraient d'approfondir la caractérisation massique et biochimique des molécules de la MEC.

En vue de mieux explorer les molécules dénaturées des PEC, nous pourrions aussi envisager de travailler en condition dénaturante pour l'analyse CES. La comparaison des monomères organiques et des complexes multimériques organiques (CES native) serait alors plus pertinente que la comparaison des empreintes massiques de CES (native) avec celles du SDS-PAGE.

Les travaux de séparation massique en électrophorèse SDS-PAGE couplée à différents révélateurs peuvent être poursuivis. Ainsi, d'autres molécules peuvent être mises en évidence telles que les glucides, lipides... Le développement de la détection de molécules spécifiques (glucide...) en western blot peut aussi être envisagé. Par ailleurs, nous pouvons aussi envisager de découper les bandes détectées sur le gel et d'identifier les molécules par spectrométrie de masse à temps de vol (Maldi-Tof : Matrix-assisted laser desorption /ionisation-Time-of-flight mass spectrometry) (Park et al., 2008).

Enfin, il serait envisageable d'approfondir l'étude de la fraction minérale. Nous savons que la fraction minérale est composée d'ions libres impliqués dans l'interaction avec les PEC, mais aussi de particules minérales solides. Une extraction séquentielle sur la MEC, suivie d'une minéralisation, nous permettrait de déterminer la part de minéraux impliqués dans leur forme soluble ou solide dans la MEC.

# **Références bibliographiques**

**A**

- Abreu A.A., Costa J.C., Araya-Kroff P., Ferreira E.C., Alves M.M. (2007) Quantitative image analysis as a diagnostic tool for identifying structural changes during a revival process of anaerobic granular sludge. *Water research*. 41, 1473-1480.
- Adav S.S., Lee D.J., Tay J.H. (2008a) Extracellular polymeric substances and structural stability of aerobic granule. *Water Research*. 42, 1644–1650.
- Adav S.S. et Lee D.J. (2008b). 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., Lai J.Y. (2010) Aerobic granules with inhibitory strains and role of extracellular polymeric substances. *Journal of Hazardous Materials*. 174, 424-428.
- Adav S.S. et Lee D.J. (2011). Characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from phenol degrading aerobic granules. *Journal of the Taiwan institute of chemical Engineers*. 42, 645-651.
- Aguilera A., Souza-Egipsy V., San Martín-Álvarez P., Amils R. (2008) Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78, 1079-1088.
- Ahimou F., Semmens M.J., Haugstad G., Novak P.J. (2007) Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology*. 73, 2905-2910.
- Ahn Y.H. (2000) Physicochemical and microbial aspects of anaerobic granular pellets. *Journal of Environmental Science and Health*. 35, 1617-1635.
- Alasonati E. et Slaveykova V.I. (2012) Effect of extraction methods on the composition and molar mass distributions of exopolymeric substances of the bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *Bioresource technology*. 114, 603-609
- Alasonati, E. et Slaveykava, V.I. (2011) Composition and molar mass characterization of bacterial extracellular polymeric substances by using chemical, spectroscopic and fractionation techniques. *Environmental chemistry*. 8, 155-162.
- Allesen-Holm M., Barken K.B., Yang L., Klausen M., Webb J.S., Kjelleberg S., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*. 59, 1114-1128.
- Andersson S., Dalhammar G., Land C.J., Kuttuva Rajarao G. (2009) Characterization of extracellular polymeric substances from denitrifying organism *Comamonas denitrificans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82, 535-543.
- Aquino S.F., Stuckey D.C. (2003) Production of soluble microbial products (SMP) in anaerobic chemostats under nutrient deficiency. *Journal of Environmental Engineering*. 129, 1007-1014.

Aquino S.F., Stuckey D.C. (2004) Soluble microbial products formation in anaerobic chemostats in the presence of toxic compounds. *Water Research*. 38, 255-266.

Arabi S., Nakhla G. (2008) Impact of protein/carbohydrate ratio in the feed wastewater on the membrane fouling in membrane bioreactors. *Journal of Membrane Science*. 324, 142-150.

Ardern, E. et Lockett, W.T. (1914) Experiments on the oxidation of sewage without the aid of filters. *Journal of the Society of Chemical Industry*. 33, p524.

Avella, A.C., Görner, T., de Donato, P. (2010b) The pitfalls of protein quantification in wastewater treatment studies. *Science of the Total Environment*. 408, 4906-4909.

Avella A.C., Delgado L.F., Görner, T., Albasi C., Galmiche M., de Donato Ph. (2010a) Effect of cytostatic drug presence on extracellular polymeric substances formation in municipal wastewater treated by membrane bioreactor. *Bioresource Technology*. 101, 518-526.

Azeredo J., Lazarova V., Oliveira R. (1999) Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: A comparative study. *Water Science and Technology*. 39, 243-250.

## **B**

Baker, A., Ward, D., Lieten, S.H., Periera, R., Simpson, E.C., Slater, M. (2004) Measurement of protein-like fluorescence in river and wastewater using a handheld spectrophotometer. *Water Research*. 38, 2934-2938.

Barker D.J., Stuckey D.C. (1999) A review of soluble microbial products (SMP) in wastewater treatment systems. *Water Research*. 33, 3063-3082.

Batstone D.J. et Keller J. (2001) Variation of bulk properties of anaerobic granules with wastewater type. *Water Research*. 35, 1723-1729.

Bhaskar P.V., Bhosle N.B. (2005) Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*. 88. 45-53.

Binet R., Létoffé S., Ghigo J.M., Delepelaire P., Wandersman C. (1997) Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters -A review. *Gene*. 192, 7-11.

Blumenkrantz N., Asboe Hansen G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*. 54, 484-489.

Bockelmann U., Lunsdorf H. et Szewzyk U. (2007) Ultrastructural and electron energy-loss spectroscopic analysis of an extracellular filamentous matrix of an environmental bacterial isolate. *Environmental Microbiology*. 9, 2137-2144.

Bockelmann U., Janke A., Kuhn R., Neu T.R., Wecke J., Lawrence J.R et Szewzyk U. (2006) Bacterial extracellular DNA forming a defined network-like structure. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letter*. 262, 31-38.

Bos R., van der Mei H.C., Busscher H.J. (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Review. 23, 179-230.

Bott, C. B. et N.G. Love. (2002) Investigating a mechanistic cause for activated sludge deflocculation in response to shock loads of toxic electrophilic chemicals. Water Environment Research. 74, 306-315.

Box J.D. (1983) Investigation of Folin-Ciocalteu phenol reagent for determination of polyphenolic substances in natural waters. Water research, 17, 511-552.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254.

Braissant O., Decho A.W., Dupraz C., Glunk C., Przekop K.M., Visscher P.T. (2007) Exopolymeric substances of sulfate-reducing bacteria: Interactions with calcium at alkaline pH and implication for formation of carbonate minerals. Geobiology 5, 401-411.

Brown M.J., Lester J.N. (1980) Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. Applied and Environmental Microbiology. 40, 179-185.

Brown M.J., Lester J.N. (1982) Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge: Effects of metal concentration. Water Research. 16, 1539-1548.

Bura R., Cheung M., Liao B., Finlayson J., Lee B.C., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (1998) Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. Water Science and Technology. 37, 325-333.

Burton K. (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. Biochemical Journal. 62, 315-323.

Bush C.A., Martin-Pastor M., Imberty A. (1999) Structure and conformation of complex carbohydrates of glycoproteins, glycolipids, and bacterial polysaccharides. Annual. Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 28, 269-293.

## C

Cadoret A., Conrad A., Block J.C. (2002). Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. Enzyme and Microbial Technology. 31, 179-186.

Cammarota M.C. et Sant 'Anna G.L. (1998) Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. Biotechnology Letter. 20, 1-4.

Caudan C. (2012) Caractérisation des EPS de boues granulaires aérobies: propriétés chimiques, localisation et implication dans la cohésion du granule. Thèse, Institut national des sciences appliquées de Toulouse.

Chan C.S., De Stasio G., Welch S.A., Girasole M., Frazer B.H., Nesterova M.V., Fakra S., Banfield J.F. (2004) Microbial polysaccharides template assembly of nanocrystal fibers. *Science*. 303, 1656-1658.

Chang W.S., van De Mortel M., Nielsen L., De Guzman G.N., Li X., Halverson L.J. (2007) Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions. *Journal of Bacteriology*. 189, 8290-8299.

Chen, W. Wersterhoff, P., Leenheer, J.A. and Booksh, K., (2003) Fluorescence Excitation-Emission Matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environmental Science and Technology*. 37, 5701-5710.

Chen, Y.G., Jiang, S., Yuan, H.Y., Zhou, Q., Gu, G.W. (2007) Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Research*. 4, 683-689.

Cheng M., Cock A.E., Fukushima T., Bond P.L. (2011) Evidence of compositional differences between the extracellular and intracellular DNA of a granular sludge biofilm. *Letters in applied microbiology*. 53, 1-7.

Christensen BE., Characklis WG. (1990) Physical and chemical properties of biofilms, in *Biofilms*. ed. Characklis, WG and Marshall KG, 93-130.

Clark, R.N. (1999) Spectroscopy of rocks and minerals, and principles of spectroscopy. In: Rencz, A.N. Ed., *Manual of Remote Sensing, Remote Sensing for the Earth Sciences*. John Wiley and Sons, New York. 3, 3-58.

Clement J. (2011) Caractéristiques et réactivité au chlore des biofilms formés à partir d'eaux naturelles enrichies en fer. Thèse spécialité Chimie et microbiologie de l'eau, Université de Poitiers.

Coble, P.G. (1996) Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry*. 51, 325-346.

Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006a) Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties: Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 237-245.

Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2006b). Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS: Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> complexation. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 246-252.

Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2007) Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *Journal of Hazardous Materials*. 140, 129-137.

Comte S., Guibaud G., Baudu M. (2008). Biosorption properties of extracellular polymeric substances (EPS) towards Cd, Cu and Pb for different pH values. *Journal of Hazardous Materials*. 151, 185-193.

Conrad A., Kontro M., Keinänen M.M., Cadoret A., Faure P., Mansuy-Huault L., Block J.C. (2003) Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*. 38, 1093-1105.

Cosme, A.M., Becker, A., Santos, M.R. Sharypova, L.A., Santos, P.M. et Moreira, L.M. (2008) The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. *Molecular Plant microbe interaction*. 21, 947-957.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. et Lappin-Scott H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*. 49, 711-745.

Coterton J.W. (1987) Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology*. 41, 435-464.

Couillard D. et Maercier G. (1992) Précipitations sélectives des métaux solubilisés biologiquement de boues aérobies d'épuration. *The Canadian Journal of chemical engineering*, 70, 1021-1029.

## D

D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebuch, 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., Joussein, E., Van Hullebuch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G. (2010b) Characterization of the mineral fraction associated to extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Environmental Science and Technology*. 44, 412-418.

D'Abzac, P., Bordas, F., Van Hullebuch, E., Lens, P.N.L., Guibaud, G. (2010c) Effects of extraction procedures on metal binding properties of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from anaerobic granular sludges. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 80, 161-168.

Davis E.M. (1988) Protein assay: A review of common techniques. *American biotechnology laboratory*. 6, 28-37.

Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis.II. Method and application to human serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121, 404-427.

De Beer D., O'Flaherty V., Thaveesri J., Lens P., Verstraete W. (1996) Distribution of extracellular polysaccharides and flotation of anaerobic sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 46, 197-201.

Decho A.W. et Lopez G.R. (1993) Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnology and Oceanography*. 38, 1633-1645.

Denecke M. (2006) Protein extraction from activated sludge. *Water Science and Technology*. 54, 175-181.

Determann S., Reuter R., Wagner P., Willkomm R. (1994) Fluorescent matter in the eastern Atlantic Ocean. Part 1: Method of measurement and near-surface distribution. *Deep-SeaResearch*. 41, 659-675.

Dignac, M.F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P., 1998 Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Water Science and Technology*. 38, 45-53.

Dominguez L., Rodriguez M., Prats D. (2010a) Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part I: Influences of extractions over three-dimensional EEM fluorescence spectroscopy fingerprint. *Desalination*. 261, 19-26.

Dominguez L., Rodriguez M., Prats D. (2010b) Effect of different extraction methods on bound EPS from MBR sludges. Part II: Influences of extractions over molecular weight distribution. *Desalination*. 262, 106-109.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28, 350-356.

Dupraz C., Reid R. P., Braissant O., Decho A. W., Norman R. S., Visscher P. T. (2009) Processes of carbonate precipitation in modern microbial mats. *Earth Science Review*. 96, 141-162.

## **E, F**

El-Mamouni R., Leduc R. et Guiot S.R. (1998) Influence of synthetic and natural polymers on the anaerobic granulation process. *Water Science and Technology*. 38, 341-347.

Esparza-Soto M., Westerhoff P.K. (2001) Fluorescence spectroscopy and molecular weight distribution of extracellular polymers from full-scale activated sludge biomass. *Water Science and Technology*. 43, 87-95.

Etchebehere C., Cabezas A., Dabert P., Muxi L. (2003) Evolution of the bacterial community during granules formation in denitrifying reactors followed by molecular, culture-independent techniques. *Water Sciences and Technology*. 48, 75-79.

Fairbanks G., Steck T.L. et Wallach D.F.H. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 10, 2606-2617.

Fang H.H.P., Chan K.Y., Xu L.C. (2000) Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy (AFM). *Journal of Microbiological Methods* 40, 89-97.

Fang H.H.P., Jia X.S. (1996) Extraction of extracellular polymer from anaerobic sludges. *Biotechnology Techniques*. 10, 803-808.

Flemming H-C., Wingender J. (2001) Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)- Part II: Technical aspects. *Water Science and Technology*. 43,9-16

Flemming H.C., Neu T.R. et Wozniak D.J. (2007) The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells”. *Journal of Bacteriology*. 189, . 7945-7947.

Flemming H.C. et Leis A.(Eds) (2001) Extracellular polymeric substances-the construction material of biofilms. *Water science and technology*. 43, p 206.

Forster CF., Clarke A.R. (1983) The production of polymer from activated sludge by ethanolic extraction and its relation to treatment plant operation. *Water Pollution Control*. 82. 430-433.

Francioso O., Sánchez-Cortés S., Casarini D., Garcia-Ramos J.V., Ciavatta C., Gessa C. (2002) Spectroscopic study of humic acids fractionated by means of tangential ultrafiltration. *Journal of Molecular Structure*. 609, 137-147.

Frolund B., Keiding K. (1994) A comparative study of biopolymers from a conventional and advanced activated sludge treatment plant. *Water Science and Technology*. 29, 137-141.

Frølund B., Griebe T., Nielsen P.H. (1995) Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43, 755-761.

Frølund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P.H. (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30, 1749-1758.

## G

Garnier C., Gorner T., Guinot-Thomas P., Chappe P., de Donato P. (2006) Exopolymeric production by bacterial strains isolated from activated sludge of paper industry. *Water research*. 40, 3315-3122.

Garnier C., Görner T., Lartiges B.S., Abdelouhab S., De Donato P. (2005). Characterization of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Research*. 39, 3044-3054.

Gatsos X., Perry A.J., Anwari K., Dolezal P., Wolyneć P.P., Likić V.A., Purcell A.W., Buchanan S.K., Lithgow T. (2008) Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*. 32, 995-1009.

Gehr R., Henry J.G. (1983) Removal of extracellular material. Techniques and pitfalls. *Water Research*. 17, 1743-1748.

Gessesse A., Dueholm T., Petersen S.B., Nielsen P.H. (2003) Lipase and protease extraction from activated sludge. *Water Research* 37, 3652-3657.

Goodwin J.A.S. et Forster C.F. (1985) A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Research*. 19, 527-533.

Görner T., De Donato P., Ameil M.H., Montarges-Pelletier E., Lartiges B.S. (2003) Activated sludge exopolymers: Separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Research*. 37, 2388-2393.

Grady, C.P.L., Daigger, G. T. et Lim, H. C. (1999) *Biological Wastewater Treatment*. Second edition. New York: Marcel Dekker, Inc.

Grotenhuis J.T., Smit M., Plugge C.M., Xu Y.S., van Lammeren A.A., Stams A.J., Zehnder A.J. (1991) Bacterial composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. 57,1942-1949.

Guibaud G., Tixier N., Bouju A., Baudu M. (2003) Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere*. 52, 1701-1710.

Guibaud, G., Van Hullebusch, E., Bordas, F., D'Abzac, P. and Joussein, E., (2009). Sorption of Cd(II) and Pb(II) by exopolymeric substances (EPS) extracted from activated sludges and pure bacterial strains, Modeling of the Metal/Ligand ratio effect and role of the mineral fraction. *Bioresource and Technology*. 100, 2959-2968.

Guo, F., Zhang, S.H., Yu, X., Wei, B. (2011) Variation of both bacterial community and extracellular polymers: The inducements of increase of cell hydrophobicity from biofloc to aerobic granule sludge. *Bioresource and Technology*. 102, 6421-6428.

## H

Hart G.W., Housley M.P., Slawson C. (2007) Cycling of D linked beta N-acetylglucosamine on nucleoplasmic protein. *Nature*. 446, 1017-1022.

Heijstra B.D., Pichler F.B., Liang Q., Blaza R.G. et Turner S.J. (2009) Extracellular DNA and Type IV pili mediate surface attachment by *Acidovorax temperans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95, 343-349.

Henderson R.K., Baker A., Murphy K.R., Hambly A., Stuetz R.M., Khan S.J. (2009) Fluorescence as a potential monitoring tool for recycled water systems :A review. *Water Research*. 43, 863-881.

Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y. (2003) Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Research*. 37, 4295-4303.

Higgins M.J., Novak J.T. (1997) Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *Journal of Environmental Engineering*. 123, 479-485.

Hoa P.T., Nair L., Visvanathan C. (2003) The effect of nutrients on extracellular polymeric substance production and its influence on sludge properties. *Water SA* 29, 437-442.

Horan N.J. et Eccles C.R. (1986) Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Research*. 20. 1427-1432.

Hsieh K.M., Murgel G.A., Lion L.W., Shuler M.L. (1994) Interactions of microbial biofilms with toxic trace metals: Observation and modeling of cell growth, attachment, and production of extracellular polymer. *Biotechnology and Bioengineering*. 44, 219-231.

Huang Y.T., Huang T.H., Yang J.H., Damodar R.A. (2012) Identifications and characterizations of proteins from fouled membrane surfaces of different materials. *International biodeterioration and biodegradation*. 66, 47-52.

Hui, F., Labbé, J.-P., Lédion, J., (2008) Analysis of mineral fraction of biofilms by infrared absorption spectrometry. *Techniques Sciences Methodes*. 5, 21-28.

Hulshoff Pol L.W., De Castro Lopes S.I., Lettinga G., Lens P.N.L. (2004) Anaerobic sludge granulation. *Water Research*. 38, 1376-1389.

Hussson G.P., Lesco M., Hui F., Ledion J. (2010) Research mineral matters and bacteria of the biofilm formation in the pipe of drinkable water. *Cahiers de l'ASEES*. 15 29-43

## **I, J, K**

Imai T., Ukita M., Liu J., Sekine M., Nakanishi H., Fukagawa M. (1997) Advance start up of UASB reactors by adding of waterabsorbing polymer. *Water Science and Technology*. 15, 399-406.

Jackson, T.A., M.M. West, and G.G. Leppard. (1999) Accumulation of heavy metals by individually analyzed bacterial cells and associated nonliving material in polluted lake sediments. *Environmental Science et Technology*. 33, 3795-380.

Jahn A., Nielsen P.H. (1995) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from biofilms using a cation exchange resin. *Water Science and Technology*. Noordwijkerhout, Neth, Pergamon Press Inc. 32, 157-164.

Jefferson K.K., Cerca N. (2006) Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 341, 119-126.

Jenkins D., Richard M.G., Daigger G.T. (1986) Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming. *Water Research Commission*, Pretoria. 165p.

Jiang H.L., Tay J.H., Tay S.T.L. (2003) Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, 602-608.

Jin B., Wilén B.M., Lant P. (2004) Impacts of morphological, physical and chemical properties of sludge flocs on dewaterability of activated sludge. *Chemical Engineering Journal* 98, 115-126.

Jonas R., Farah L.F. (1998) Production and application of microbial cellulose. *Polymer Degradation and Stability*. 59, 101-106.

Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V., Manem J. (1995) Chemical and structural (2D) linkage between bacteria within activated sludge flocs. *Water Research*. 29, 1639-1647.

Jorand F., Boué-Bigne F., Block J.C., Urbain V. (1998) Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Science and Technology* 37, 307-315.

Joshi M.P., Juwarkar A.A. (2009) *In vivo* studies to elucidate the role of extracellular polymeric substances from *Azotobacter* in immobilization of heavy metals. *Environmental science et technology*. 43, 5884-5889.

Juang, Y.-C., Adav, S.S. and Lee, D.-J., Tay, J.-H., (2010) Stable aerobic granules for continuous-flow reactors, precipitating calcium and iron salts in granular interiors. *Bioresource and Technology*. 101, 8051-8057.

Judd, S. (2008) The status of membrane bioreactor technology. *Trends in Biotechnology*. 26, 109.

Julien C. (2011) Caractéristiques et réactivité au chlore des biofilms formés à partir d'eaux naturelles enrichies en fer. Thèse spécialité Chimie et microbiologie de l'eau, Université de Poitiers.

Kalogo Y., Seka A.M., Verstraete W. (2001) Enhancing the startup of a UASB reactor treating domestic wastewater by adding a water extract of *Moringa oleifera* seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55, 644- 651.

Kämpfer P., Weltin D., Hoffmeister D. and Dott W. (1995) Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Water Research*. 29, 1585-1588.

Kara F., Gurakan G.C., Sanin F.D. (2008) Monovalent cations and their influence on activated sludge floc chemistry, structure, and physical characteristics. *Biotechnology BioEngineering*. 100, 231-239.

Kazy S.K., Sar P., Singh S.P., Sen A.K., D'Souza S.F. (2002) Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Synthesis, chemical nature and copper binding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18, 583-588.

Keiding K., Wybrandt L., Nielsen P.H. (2001) Remember the water - A comment on EPS colligative properties. *Water Science and Technology*. 43, 17-23.

Klock J.H., Wieland A., Seifert R., Michaelis W. (2007) Extracellular polymeric substances (EPS) from cyanobacterial mats: Characterisation and isolation method optimisation. *Marine Biology* 152, 1077-1085.

Kumar A.S., Mody K., Jha B. (2007) Bacterial exopolysaccharides-a perception. *Journal of basic microbiology*. 47, 103-117.

Kuo W.C., Parkin G.F. (1996) Characterization of soluble microbial products from anaerobic treatment by molecular weight distribution and nickel-chelating properties. *Water Research* 30, 915-922.

## L

Laemmli U.K. (1970) Cleaving of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Laspidou C.S., Rittmann B.E. (2002) A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*. 36, 2711-2720.

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, 450-458.

Lee H., Song M., Hwang S., (2003) Optimizing bioconversion of deproteinated cheese whey to mycelia of *Ganoderma lucidu*. *Journal of Process Biochemistry*. 38, 1685-1693.

Leppard G.G., Droppo I.G., West M.M., Liss S.N. (2003) Compartmentalization of metals within the diverse colloidal matrices comprising activated sludge microbial flocs. *Journal of Environmental Quality*. 32, 2100-2108.

Li D.H., Ganczarczyk J.J. (1990) Structure of activated sludge flocs. *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 57-65.

Li X.Y., Yang S.F. (2007) Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. *Water Research*. 41, 1022-1030.

Li Z., Clarke A.J., Beveridge T.J. (1998) Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *Journal of Bacteriology*. 180, 5478-5483.

Liang Z., Li W. Yang S., Du P. (2010) Extraction and structural characteristics of extracellular polymeric substances (EPS), pellets in autotrophic nitrifying biofilm and activated sludge. *Chemosphere*. 81, 626-632.

Liao B.Q., Allen D.G., Droppo I.G., Leppard G.G., Liss S.N. (2001) Surface properties of sludge and their role in bioflocculation and settleability. *Water Research*. 35, 339-350.

- Lin, Y., De Kreuk, M., Van Loosdrecht, M.C.M., Adin, A., (2010) Characterization of alginate-like exopolysaccharides isolated from aerobic granular sludge in pilot-plant. *Water Research*. 44, 3355-3364.
- Liss S.N., Droppo I.G., Flannigan D.T., Leppard G.G. (1996). Floc architecture in wastewater and natural riverine systems. *Environmental Science and Technology* 30(2): 680-686.
- Liss, S. N.; Liao, B. Q.; Droppo, I. G.; Alien, D. G.; Leppard, G. G. (2002) Effect of solids retention time on floc structure. *Water science and technology*. 46,431-438.
- Liu H., Fang H.H.P. (2002a) Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnology and Bioengineering*. 80, 806-811.
- Liu H., Fang H.H.P. (2002b) Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *Journal of Biotechnology* 95, 249-256.
- Liu T., Chen Z.L., Yu W.Z. et You S.J. (2011) Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pré-ozonation using three- dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research*. 45, 2111-2121.
- Liu W.T., Chan O.C., Fang H.H.P. (2002) Characterization of microbial community in granular sludge treating brewery wastewater. *Water Research* 36, 1767-1775.
- Liu X.M., Sheng G.P., Yu H.Q. (2007) DLVO approach to the flocculability of a photosynthetic H<sub>2</sub> -producing bacterium, *Rhodospseudomonas acidophila*. *Environmental Sciences and Technology*. 41, 4620-4625.
- Liu Y., Fang H.H.P. (2003) Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 33, 237-273.
- Liu Y., Lam M.C., Fang H.H.P. (2001) Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge. *Water Science and Technology*. 43. 59-66.
- Liu Y., Tay J.H. (2002). The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*. 36, 1653-1665.
- Liu Y., Tay J.H. (2004) State of the art of biogranulation technology for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*. 22, 533-563.
- Liu Y., Xu H.L., Yang S.F., Tay J.H. (2003) Mechanisms and models for anaerobic granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Research*. 37, 661-673.
- Liu Y., Yang S.F., Tay J.H., Liu Q.S., Qin L., Li Y. (2004a) Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology*. 34, 371-379.
- Liu Y.Q., Liu Y., Tay J.H. (2004b) The effects of extracellular polymeric substances on the formation and stability of biogranules. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65, 143-148.

Liu T., Chen Z.-L., Yu W.-Z., You S.-J., (2011) Characterization of organic membrane foulants in a submerged membrane bioreactor with pre-ozonation using three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research*. 45, 2111-2121.

Lorenz M.G., Wackernagel W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*. 58, 563-602.

Lowry O., Rosebrough N., Fan A., Randall R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

## M

Mah T.F.C., O'Toole G.A. (2001) Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9, 34-39.

Martínez O.F., Lema J. M., Méndez P.R., Cuervo-López, F.M. and Gómez J. (2004) Role of exopolymeric protein on the settleability of a nitrifying sludge. *Bioresource. Technology*. 94, 43-48.

Mayer C., Moritz R., Kirschner C., Borchard W., Maibaum R., Wingender J. and Flemming H.C. (1999). The role of intermolecular interactions: Studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 26, 3-16.

McHugh S., Carton M., Mahony T., O'Flaherty V. (2003) Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*. 219, 297-304.

Mcnab R., Forbes H., Handley P., Loach D.M., Tannock G.W., Jenkison H.F. (1999) Cell wall-anchored CshA polypeptide (259 kilodaltons) in *Streptococcus gordonii* forms surface fibrils that confer hydrophobic and adhesive properties. *Journal of Bacteriology*. 181, 3087-3095.

McSwain B.S., Irvine R.L., Hausner M., Wilderer P.A. (2005) Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 1051-1057.

Meisen, S., Wingender, J., Telgheder, U. (2008) Analysis of microbial extracellular polysaccharides in biofilms by HPLC. Part I: Development of the analytical method using two complementary stationary phases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391, 993-1002.

Metcalf et Eddy, Inc. (2003) *Wastewater engineering, treatment and reuse*. 4<sup>th</sup> ed., Mc Graw Hill Ed., p 1819.

Metzger U., Lankes U., Fischpera K., Frimmel F.H. (2009) The concentration of polysaccharides and proteins in EPS of *Pseudomonas putida* and *Aureobasidium pullulans* as revealed by <sup>13</sup>C CPMAS NMR spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85, 197-206.

Mikes J., Siglova M., Cejkova A., Masak J. et Jirku V. (2005) The influence of heavy metals on the production of extracellular polymer substances in the processes of heavy metal ions elimination. *Water science technology*. 52, 51-56.

Mikes J., Siglova M., Cejkova A., Masak J., Jirku V. (2005) The influence of heavy metals on the production of extracellular polymer substances in the processes of heavy metal ions elimination. *Water Science and Technology* 52, 151-156.

Mikkelsen L.H. (2003) Applications and limitations of the colloid titration method for measuring activated sludge surface charges. *Water Research* 37, 2458-2466.

Mirelman D (1986) Microbial lectins and agglutinins: Properties and biological activity.

Mishra A. et Jha B. (2009) Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. *Bioresource Technology*. 100, 3382-3386.

Molin S., Tolker-Nielsen T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*. 14, 255-261.

Moller, H.J., Poulsen, J.H. (2002) Staining of glycoproteins/proteoglycans in SDS- gels. *Protein Protocols Handbook 2nd Edition*.

Morgan J.W., Evison L.M., Forster C.F. (1991) Changes to the microbiological ecology in anaerobic digesters treating ice cream wastewater during start-up. *Water Research*. 25, 639-653.

Morgan J.W., Forster C.F., Evison L. (1990) A comparative study of the nature of biopolymers extracted from anaerobic and activated sludges. *Water Research* 24, 743-750.

## N, O

Ni B.J., Fang F., Xie W.M., Sun M., Sheng G.P., Li W.H., Yu H.Q. (2009) Characterization of extracellular polymeric substances produced by mixed microorganisms in activated sludge with gel-permeating chromatography, excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy measurement and kinetic modeling. *Water Research*. 43, 1350-1358.

Ni B.J., Zeng R.J., Fang F., Xu J., Sheng G.P., Yu H.Q. (2009a) A novel approach to evaluate the production kinetics of extracellular polymeric substances (EPS) by activated sludge using weighted nonlinear least-squares analysis. *Environmental Science and Technology* 43, 3743-3750.

Ni J.B., Rittmann B.E., Yu H.Q. (2011) Soluble microbial products and their implications in mixed culture biotechnology. *Trends in biotechnology*. 29, 454-463.

Ni, B.J., Fang, F., Xie, W.M., Sun, M., Sheng, G.P., Li, W.H., Yu, H.Q. (2009) Characterization of extracellular polymeric substances produced by mixed microorganisms in

activated sludge with gel-permeating chromatography, excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy measurement and kinetic modeling. *Water Research*. 43, 1350-1358.

Nielsen P.H., Frolund B. and Keiding K. (1996) Changes in the composition of extracellular polymeric substances in activated sludge during anaerobic storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44, 823-830.

Nielsen P.H., Keiding K. (1998) Disintegration of activated sludge flocs in presence of sulfide. *Water Research*. 32, 313-320.

Nielsen P.H., Jahn A. (1999) Extraction of EPS. In: Wingender J, Neu TR, Fleming H.C, editors. *Microbial extracellular polymeric substances: Characterization, structure and function*. Berlin: springer.

Nyquist R.A., Kagel R.O., (1971) *IR Spectra of inorganic compounds*, IR Spectra of inorganic compounds, Academic press, New York, London.

O'Toole G.A., Kaplan H.B. and Kolter R., (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 54, 49-79.

O'Flaherty V., Collins G., Mahony T. (2006) The microbiology and biochemistry of anaerobic bioreactors with relevance to domestic sewage treatment. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 5, 39-55.

Omoike A., Chorover J. (2004) Spectroscopic study of extracellular polymeric substances from *Bacillus subtilis*: Aqueous chemistry and adsorption effects. *Biomacromolecules*. 5, 1219-1230.

Ortega-Morales B.O., Santiago-Garcia J.L., Chan-Bacab M.J., Moppert X., Miranda-Tello E., Fardeau M.L., Carrero J.C., Bartolo-Perez P., Valadez-Gonzalez A., Guezennec J. (2006) Characterization of extracellular polymers synthesized by tropical intertidal biofilm bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 254-264.

Otzen, D., Nielsen, P.H., (2008) We find them here, we find them there: Functional bacterial amyloid. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65, 910-927.

## **P, Q**

Park C., Novak J.T., Helm R.F., Ahn Y.O., Esen A. (2008) Evaluation of the extracellular proteins in full-scale activated sludges. *Water Research*. 42, 3879-3889.

Park C., Novak J.T. (2009) Characterization of lectins and bacterial adhesins in activated sludge flocs. *Water Environment Research*. 81, 755-764.

Peterson G.L. (1979) Review of the folin phenol protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Analytical biochemistry*. 100, 201-219.

Peyfoon E., Meyer B., Hitchen P.G., Panico M., Morris H.R., Haslam S.M., Albers S.V., Dell A. (2010) The S-Layer glycoprotein of the Crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius* is glycosylated at multiple sites with chitobiose-linked N-glycans. *Archaea*. doi:10.1155/2010/754101

Poulin R., Lu L., Ackermann B., Bey P., Pegg A.E. (1992) Mechanism of the irreversible inactivation of mouse ornithine decarboxylase by alpha-difluoromethylornithine. Characterization of sequences at the inhibitor and coenzyme binding sites. *Journal of Biological Chemistry*. 267, 150-158.

Poxon T.L., Darby J.L. (1997) Extracellular polyanions in digested sludge: measurement and relationship to sludge dewaterability. *Water Research*. 3, 1749-1758.

Prosser, B.L. Taylor D., Dix B.A. et Cleeland R. (1987) Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 31, 1502-1506

Puñal A., Brauchi S., Reyes J.G., Chamy R. (2003) Dynamics of extracellular polymeric substances in UASB and EGSB reactors treating medium and low concentrated wastewaters. *Water Science and Technology*. 48, 41-49.

Puñal A., Trevisan M., Rozzi A., Lema J.M. (2000) Influence of C/N ration on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors. *Water research*. 34, 2614-2619.

Purohit H.J., Kapley A., Moharikar A.A. et Narde G. (2003) A novel approach for extraction of PCR-compatible DNA from activated sludge samples collected from different biological effluent treatment plants. *Journal of Microbiological Methods*. 52, 315-323.

Qin L., Tay J.H., Liu Y. (2004) Selection pressure is a driving force of aerobic granulation in sequencing batch reactors. *Process Biochemistry*. 39, 579- 584.

Quarmby J., Forster C.F. (1995) An examination of the structure of UASB granules. *Water Research*. 29, 2449-2454.

## R

Ramesh M., Saravanakumar R.M., Karutha P.S. (2006) Benzyl amino purine and adenine sulphate induced multiple shoot and root induction from nodal explants of Brahmi, [*Bacopa monnieri* (Linn.)Penn.]. *Natural product Radiance*. 5, 44-51.

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, 1529-1538.

Ras M., Girbal-Neuhauser E., Paul E., Spérandio M., Lefebvre D. (2008) Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Research*. 42, 1867-1878.

Rätto M., Verhoef R., Suihko M.L., Blanco A., Schols H.A., Voragen A.G.J., Wilting R., Siika-Aho M., Buchert J. (2006) Colanic acid is an exopolysaccharide common to many

enterobacteria isolated from paper-machine slimes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33, 359-367.

Raunjker K., Hvittved-Jacobsen T. et Nielsen P.H. (1994) Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Water Research*. 28, 251-262.

Roberson E.B., Firestone M.K. (1992) Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas sp.* *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 1284-1291.

Roberts I.S. (1996) The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 50, 285-315.

Rosenberger S., Laabs C., Lesjean B., Gnirss R., Amy G., Jekel M. et Schrotter J.C.(2006) Impact of colloidal and soluble organic material on membrane performance in membrane bioreactors for municipal wastewater treatment. *Water Research*. 40, 710–720.

Ruas-Madiedo P. et de los Reyes-Gavilán C.G. (2005) Invited Review: Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science*. 88, 845-856.

Rudd T., Sterritt R.M., Lester J.N. (1984) Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process. *Journal of the Water Pollution Control Federation*. 56, 1260-1268

## S

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sand W., Gehrke T. (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology*. 157, 49-56.

Schmidt J.E., Ahring B.K. (1994) Extracellular polymers in granular sludge from different upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42, 457-462.

Schmidt J.E., Ahring B.K. (1996) Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 49, 229-246.

Seka M.A., Verstraete W. (2003) Test for assessing shear sensitivity of activated sludge flocs: A feasibility study. *Water Research*. 37, 3327-3334.

Senesi N. (1990) Molecular and quantitative aspects of the chemistry of fulvic acid and its interactions with metal ions and organic chemicals. Part II. The fluorescence spectroscopy approach. *Analytica Chimica Acta*. 232, 77-106.

Sesay M.L., Ozcengiz G., Dilek Sanin F. (2006) Enzymatic extraction of activated sludge extracellular polymers and implications on bioflocculation. *Water Research*. 40, 1359-1366.

Seviour T., Bogdan B.C., Pijuan M., Yuan Z. (2010) Purification and conformational analysis of a key exopolysaccharide component of mixed culture aerobic sludge granules. *Environmental sciences and technology*. 44, 4729-4734.

Sheng G.P., Yu H.Q. (2006) Relationship between the extracellular polymeric substances and surface characteristics of *Rhodopseudomonas acidophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72, 126-131.

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.

Sheng G.P., Yu H.Q., Li X.Y. (2010) Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. *Biotechnology advances*. 28, 882-894.

Sheng G.P., Yu H.Q., Yu Z. (2005) Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas acidophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67, 125-130.

Sheng G.P., Yu H.Q., Yue Z.B.. (2006b) Factors influencing the production of extracellular polymeric substances by *Rhodopseudomonas acidophila*. *International biodeterioration and biodegradation*. 58, 89-93.

Sheng, G.-P., Yu, H.-Q., (2006) Characterization of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Research*. 40, 1233-1239.

Shin HS., Kang ST., Nam SY. (2001) Effect of carbohydrate and protein in the EPS on sludge settling characteristics. *Water Science and Technology*, 43, 193-196

Simon, S., Païro, B., Villain, M., D'Abzac, P., Van Hullebusch E., and Lens, P. (2009) Evaluation of size exclusion chromatography (SEC) for the characterization of extracellular polymeric substances (EPS) in anaerobic granular sludges. *Bioresource Technology*. 100, 6258-6268.

Singleton D.R., Masuoka J., Hazen K.C. (2001) Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. *Journal of Bacteriology*. 183, 3582 -3588.

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. et Klenk D.C. (1985) Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*. 150, 76-85.

Sobeck D.C., Higgins M.J. (2002) Examination of three theories for mechanisms of cation-induced bioflocculation. *Water Research*. 36, 527-538.

Specht C.H., Kumke M.U., Frimmel F.H. (2000) Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography. *Water research*. 34, 4063-4069.

Sponza D.T. (2002) Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady- and unsteady-state activated sludge systems. *Process Biochemistry*. 37, 983-998.

Sponza D.T. (2003) Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 375-385.

Steinberger R.E., Holden P.A. (2005) Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 5404-5410.

Sutherland I.W. (2001a) Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology*. 147, 3-9.

Sutherland I.W. (2001b) Exopolysaccharides in biofilms, flocs and related structures. *Water Science and Technology*. 43, 77-86.

## T

Tao Y. et Zhang L. (2008) Characterization of polysaccharide–protein complexes by size-exclusion chromatography combined with three detectors. *Carbohydrate Research*. 343, 2251-225.

Tay J.H., Liu Q.S., Liu Y. (2001) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*. 33, 222-226.

Tay J.H., Liu Q.S. et Liu Y. (2001) The role of cellular polysaccharides in the formation and stability of aerobic granules. *Letters in Applied Microbiology*. 33, 222-226.

Tiwari M.K., Guha S., Harendranath C.S., Tripathi S. (2005) Enhanced granulation by natural ionic polymer additives in UASB reactor treating low-strength wastewater. *Water Research*. 39, 3801- 3810.

Tiwari M.K., Guha S., Harendranath C.S., Tripathi S. (2006) Influence of extrinsic factors on granulation in UASB reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71,145-154.

Tobisawa, Y., Imai, Y., Fukuda, M., Kawashima, H. (2010) Sulfation of colonic mucins by *N*-acetylglucosamine 6-*O*-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice' *The Journal of Biological Chemistry*. 285, 6750-6760.

Tsai B.N., Chang C.H., Lee D.J. (2008) Fractionation of soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Environmental Technology* 29, 1127-1138.

Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A. (2003) Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *Federation European Microbiological Societies, Microbiology Letter*. 223, 287-92.

## U, V

Urbain V. (1992) Caractérisation physico-chimique des boues activées en relation avec leur propriété de décantation, Thèse soutenue à l'Université de Nancy 1, Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau.

Urbain V., Block J.C., Manem J. (1993) Bioflocculation in activated sludge: An analytic approach. *Water Research*. 27, 829-838.

Van Langerak E.P.A., Ramaekers H., Wiechers J., Veecken A.H.M., Hamelers H.V.M. et Lettinga G. (2000) Impact of location of CaCO<sub>3</sub> precipitation on the development of intact anaerobic sludge. *Water research*. 34, 437-446.

Villain M., Simon S., Bourven I., Guibaud G. (2010) The use of a new mobile phase, with no multivalent cation binding properties, to differentiate extracellular polymeric substances (EPS), by size exclusion chromatography (SEC), from biomass used for wastewater treatment. *Process Biochemistry*. 45, 1415-1421.

Vivanco E., Puñal A., Chamy R. (2006) Effect of addition of an exogenous exopolymeric substance in UASB and EGSB reactors. *Water Science and Technology*. 54, 25-31.

## W

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.

Wang Z., Wu Z., Tang S. (2009) Extracellular polymeric substances (EPS) properties and their effects on membrane fouling in a submerged membrane bioreactor. *Water Research*. 43, 2504-2512.

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.

Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C. et Mattick J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295, 1487.

Wilén B.M. et Balmér P. (1999) The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs. *Water Research*. 33, 391-400.

Wilén B.M., Jin B., Lant P. (2003a) The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Water Research*. 37, 2127-2139.

Wilén B.M., Jin B., Lant P. (2003b) Relationship between flocculation of activated sludge and composition of extracellular polymeric substances. *Water Science and Technology*. 47, 95-103.

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 Biointerfaces*. 18, 145-156.

Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (1999) *Microbial Extracellular Polymeric Substances: characterisation, structure and function*. New York, Springer.

Wisniewski C. et Grasmick A. (1998) Floc size distribution in a membrane bioreactor and consequences for membrane fouling. *Colloids and Surface*. 138, 403-411.

Wuertz S., Spaeth R., Hinderberger A., Griebel T., Flemming H.C., Wilderer P.A. (2001) A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals. *Water Science and Technology*. 43, 25-31.

## X, Y

Xu C.H., He P.J., Wang G.Z., YU G.H., Shao L.M. (2010) Enhanced storage stability of aerobic granules seeded with pellets. *Bioresource Technology*. 101, 8031-8037.

Yang S.F., Tay J.H., Liu Y. (2004) Inhibition of free ammonia to the formation of aerobic granules. *Biochemical Engineering Journal*. 17, 41-48.

Yao M., Luo H.Y., Xie X.Q., Dai L.H., Wu W., Zhang K.S. (2012) Three dimensional excitation-emission fluorescence spectra of exopolymer substances in activated sludge of WWT. *China Environmental Science*. 32, 94-99.

Ye F., Ye Y., Li Y. (2011) Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. *Journal of Hazardous Materials*. 188, 37-43.

Yi S., Tay J.H., Maszenan A.M., Tay S.T.L. (2003) A culture-independent approach for studying microbial diversity in anaerobic granules. *Water Science and Technology*. 47, 283-290.

Yu G.H., He P.J., Shao L.M. (2009) Characteristics of extracellular polymeric substances (EPS) fractions from excess sludges and their effects on bioflocculability. *Bioresource Technology*. 100, 3193-3198.

Yu G.H., He P.J., Shao L.M. et Lee D.J. (2007) Enzyme activities in activated sludge flocs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77, 605-612.

Yu H.Q., Fang H.H., Tay J.H. (2000) Effects of  $Fe^{2+}$  on sludge granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. *Water Science and Technology*. Noordwijkerhout, Neth, Int Water Assoc. 4, 199-205.

Yu H.Q., Tay J.H., Fang H.H.P. (2001) The roles of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Water Research*. 35, 1052-1060.

Yuncu B., Sanin F.D., Yetis U. (2006) An investigation of heavy metal biosorption in relation to C/N ratio of activated sludge. *Journal of Hazardous Materials*. 137, 990-997.

## Z

Zegeye A., Mustin C., Jorand F. (2010) Bacterial and iron oxide aggregates mediate secondary iron mineral formation: Green rust versus magnetite. *Geobiology*. 8, 209-222.

Zhang D., Pan X., Mostofa K.M.G., Chen X., Mu G., Wu F., Liu J., Song W., Yang J., Liu Y., Fu Q. (2010) Complexation between Hg(II) and biofilm extracellular polymeric substances: An application of fluorescence spectroscopy. *Journal of Hazardous Materials*. 175, 359-365.

Zhang D., Wang J., Pan X. (2006) Cadmium sorption by EPSs produced by anaerobic sludge under sulfate-reducing conditions. *Journal of Hazardous Materials*. 138, 589-593.

Zhang L., Feng X., Zhu N., Chen J. (2007) Role of extracellular protein in the formation and stability of aerobic granules. *Enzyme and Microbial Technology*. 41, 551-557.

Zhang X., Bishop P.L., Kinkle B.K. (1999) Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Science and Technology*. 39, 211-218.

Zhang X.Q. et Bishop P.L. (2001) Spatial distribution of extracellular polymeric substances in biofilms. *Journal of Environmental Engineering*. 127, 850-856.

Zita A., Hermansson M. (1997) Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1168-70.

# **Liste des Publications et Communications**

**Sous presse**

Bourven I., Simon S., Guibaud G. (sous presse) Influence of extraction method on size exclusion chromatography fingerprints of EPS from wastewater sludges. *Environnemental Technology*. accepté le 01/05/2012 sous le n° TENT-OA-2012-0207.R1, DOI:10.1080/09593330.2012.692722

**2012**

Guibaud G., Bhatia D., D'Abzac P., Bourven I., Bordas F., Van Hullebusch E., Lens P.N.L. (2012) Cd(II) and Pb(II) sorption by extracellular polymeric substances (EPS) extracted from anaerobic granular biofilms: evidence of a pH sorption-edge. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 43, 444–449.

Bourven I., Costa G., Guibaud G. (2012). Qualitative characterization of the protein fraction of Exopolymeric Substances (EPS) extracted with EDTA from sludge. *Bioresource Technology* 104, 486-496.

**2011**

Bourven I., Al Char R., Jaziri K., Casellas M., Dagot C., Guibaud G. (2011). Effects of sonication, heating and fungal enzymatic digestion on the ability of activated sludge supernatant to bind Pb and Cd. *Chemical Engineering Journal* 172, 75-83.

Bourven I., Joussein E., Guibaud G. (2011). Characterisation of the mineral fraction in extracellular polymeric substances (EPS) from activated sludges extracted by eight different methods. *Bioresource Technology* 102, 7124-7130.

**2010**

Villain M., Simon S., Bourven I., Guibaud G. (2010). The use of a new mobile phase, with no multivalent cation binding properties, to differentiate extracellular polymeric substances (EPS), by size exclusion chromatography (SEC), from biomass used for wastewater treatment. *Process Biochemistry* 45, 1415-1421.

**Soumis**

Bhatia,D., Bourven I., Bordas F., Simon S., van Hullebusch E., Rossano S., Lense P.N.L., Guibaud G. Interest of florescence detection to determine Proteins and Humic-like substances fingerprints of ExoPolymeric Substances (EPS) from biological sludges performed by Size Exclusion Chromatography (SEC) *soumis à Bioresource Technology en juillet 2012*

Metivier R., Bourven I., Labanowski J., Guibaud G. Interaction of Erythromycin and Acetaminophen with soluble and bound extracellular polymeric substances (EPS) from various biological sludges and natural biofilm: A fluorescence quenching study. *soumis à Chemosphere en juillet 2012.*

**A soumettre**

Bourven I., Bachellerie G., Guibaud G., Costa G. Evidence of glycoproteins and sulfated proteoglycan-like presence in EPS from anaerobic granular sludge: Possible implications for interactions between granular components.

### **Conférences Internationales**

Guibaud G., Bourven I., D'Abzac P., Villain M., Bordas F., Simon S., Joussein E., Van Hullebush E., Lens P. N. L. New approaches to better characterize Extracellular Polymeric Substances (EPS) extracted by various methods from biofilms sampled from wastewater treatment processes. (Conférence) ACE, European Meeting on Environmental Chemistry 10, Limoges France, 2009.

### **Conférence nationale**

Guibaud G., Bourven I., d'Abzac P., Villain M., Comte S ;, Bordas F., Simon S., Joussein E., van Hullebush E., Lens P.N.L, Baudu M. Extraction et caractérisation de substances exopolymériques (EPS) de biofilms utilisés dans les traitements d'eaux usées (Conférence) Voyages au sein d'un biofilm, Nancy, France, 2011.

Guibaud G., Bordas F., Simon S., Joussein E., Bourven I., Bhatia D., Van Hullebush E., Lens P.N.L. Characterization and metal binding properties of Extracellular Polymeric Substances (EPS) extracted by various methods from biofilms from wastewater treatment processes (Conférence) Oléron, France, 2012.

### **Communication internationale sous forme de poster**

Bourven I., Joussein E., Guibaud G. Use of Size Exclusion Chromatography (SEC) and Scanning Electron Microscopy coupled with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) for better characterization of the Extracellular Polymeric Substances (EPS) extracted by various methods from activated sludges. (Poster) 12th symposium water Cannes, France, 2010.

### **Communication nationale sous forme de poster**

Bourven I., Costa G., Guibaud G. Impact of four extraction methods of Extracellular Polymeric Substance (EPS) on Protein, glycoprotein and proteoglycan patterns (Poster) Voyages au sein d'un biofilm, Nancy, France, 2011.