



HAL
open science

Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de la filamentation de *Sphaerotilus natans*, bactérie modèle du foisonnement invasif en boues activées

Sébastien Lacroix

► **To cite this version:**

Sébastien Lacroix. Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de la filamentation de *Sphaerotilus natans*, bactérie modèle du foisonnement invasif en boues activées. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech, 2008. Français. NNT : 2008AGPT0022 . pastel-00623223

HAL Id: pastel-00623223

<https://pastel.hal.science/pastel-00623223>

Submitted on 13 Sep 2011

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

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

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier la Direction Générale du Cemagref et la Région Ile de France pour avoir financé cette thèse.

Je tiens également à remercier, Monsieur Gérard SACHON, Directeur du groupement du Cemagref d'Antony, Monsieur Gildas LE BOZEC et Madame Cécile LOUMAGNE, successivement chefs de l'unité Hydrosystèmes et Bioprocédés, pour m'y avoir accueilli et pour avoir permis le bon déroulement de ma thèse.

Je remercie également Monsieur Jean-Jacques PERNELLE et Madame Marielle BOUIX, pour avoir codirigé cette thèse, ainsi que pour leur aide et leurs conseils tout au long de ces trois années.

Je remercie Monsieur Daniel THOMAS pour avoir accepté de présider le jury de thèse.

Merci à Messieurs Abdelghani SGHIR et Valter TANDOÏ pour avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteurs, ainsi qu'à Madame Gilberte GAVAL en qualité d'examineur invité.

Je remercie également Madame Laure GRAVELEAU, Messieurs Théodore BOUCHEZ et Patrick DABERT pour leurs participations aux comités de thèses, pour leurs précieux conseils et leurs remarques pertinentes.

Merci à Madame Josiane COURTOIS et Monsieur Bernard COURTOIS pour avoir également participé aux comités de thèse et pour l'accueil au sein de leur Laboratoire des Polysaccharides Microbiens et Végétaux de l'Université d'Amiens.

Merci à Monsieur Alain GUILLOT, chercheur à l'INRA de Jouy-en-Josas, pour son aide sur la partie protéomique ainsi que pour ses conseils et sa disponibilité.

Merci Mademoiselle Sarrah GHORBAL, pour son aide très précieux lors des très longues journées de suivis de réacteurs et pour les analyses en cytométrie en flux.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Alain HEDUIT, animateur du TR Epure et Madame Sylvie GILLOT, chef de l'équipe Epure du groupement d'Antony, pour leur soutien et leur gentillesse.

Un merci tout particulier à tous les membres de l'équipe Epure d'Antony, qui plus que des collègues, sont devenus des amis :

- *Antoine "Peter " SOUEF et Yannick "Steven" FAYOLLE, les deux mecs les plus classes du monde, avec qui j'ai eu le plaisir de partager mon bureau ainsi que des moments mémorables, et qui ont su rendre la période de rédaction moins difficile.*
- *Stéphane mon sarthois préféré, merci pour les parties de pêche, de ping-pong, les rillettes, etc... Et comme tu dis si bien : Aller l'OM !!!!!*
- *Vivien, qui, s'il arrive à se détendre, me battra peut-être un jour au squash... Merci pour tout mon grand.*
- *Pierrot, merci pour ta bonne humeur si communicative, j'attends avec impatience de découvrir ta Martinique !*
- *Jean-Mi, mon premier coloc de bureau, on s'est bien marré tous les deux, merci.*
- *Merci infiniment à Lauriane pour son aide précieuse lors des derniers mois de thèse, Pour les manip mais aussi pour avoir corrigé je ne sais combien de fois les fautes d'orthographe dans mon mémoire. Je n'ai qu'une chose à dire : Il reste des fautes !!! ☺*
- *Hélène même si nous ne nous serons que croisés.*
- *Et tous ceux que j'ai pu croiser au sein de l'équipe durant ces quelques années : Laetitia, Cécile, Mariem, Aurore, Samantha, Sarah, Eric, Jean-Marc, et désolé si j'en oublie...*

Merci également à :

Valérie et Sophie, notre tandem administratif infernal, pour leur bonne humeur, leur gentillesse et tous les services rendus. Gros bisous les filles.

À tous mes collègues sportifs du frisbee, du basket, du foot, vous m'avez évité de prendre trop de kilos...ainsi qu'à tous les membres de l'unité, pour leur bonne humeur et leur sympathie. Ça va vraiment être difficile de retrouver une ambiance comme ça !

À mes amis Carole, Vivi, Damien, Valou, Dany, Evelyne, Seb, Louis, Marc, Véro, Valounette , Laurent, Cécile, Cyril, Rémy, Greg et Cécile pour leur affection et leur soutien. Merci d'être là. J'espère pouvoir vous voir plus souvent maintenant.

À Morgane, merci ma puce pour tout ce que tu m'as apporté.

À tous ceux que je ne cite pas mais qui savent qu'ils comptent pour moi.

Je remercie de tout mon cœur mes grands-parents et ma petite sœur Émilie.

Enfin, j'adresse le plus grand des remerciements à mes parents sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Maman et Papa, merci pour votre soutien, votre amour et tout le reste. Aucun mot ne sera jamais à la hauteur de ce que je ressens.

Résumé :

Le foisonnement filamenteux est un problème récurrent dans de nombreuses stations d'épuration à boues activées. L'objectif de ces travaux est d'améliorer la compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans la filamentation des microorganismes, afin de pouvoir orienter de futures stratégies de lutte contre le phénomène de bulking. *Sphaerotilus natans*, qui peut croître réversiblement sous forme monocellulaire ou filamenteuse, a été utilisée comme bactérie modèle pour cette étude.

Différents types de cultures, ainsi que des suivis par cytométrie en flux et marquage au cFDA/SE, ont montré que les diverses souches de *S. natans* adoptent des morphologies différentes et que les filaments croissent par divisions cellulaires successives et non par un chaînage des bactéries. Une analyse par RT-QPCR a mis en évidence que l'expression du gène *sthA* augmente fortement après induction de la filamentation et reste ensuite à un niveau élevé. Une comparaison de l'expression protéique des formes monocellulaire et filamenteuse, par LC-MS-MS, a permis d'identifier des protéines impliquées dans la filamentation, et notamment dans la synthèse de la gaine.

La concentration intracellulaire en ARNr, mesurée par RT-QPCR, varie durant la croissance de *S. natans* et d'autres microorganismes, entraînant une diminution importante de l'intensité du marquage FISH, mesurée par cytométrie en flux. L'utilisation de la technique FISH pour quantifier des microorganismes est donc remise en question, d'autant plus dans des matrices aussi complexes que les boues activées. Ces observations mettent également en doute l'hypothèse, émise en utilisant ce mode de quantification, d'une déstructuration des filaments consécutive à un retour à des conditions de culture plus favorables.

Mots clés : bactérie filamenteuse, *Sphaerotilus natans*, boues activées, bulking, mécanismes de filamentation, protéomique, ARNr, FISH, RT-QPCR, LC-MS-MS, Cytométrie en flux.

Abstract:

Filamentous bulking is a widespread problem in many activated sludge wastewater treatment plants. The objective of this study is to improve the understanding of physiological and molecular mechanisms of filamentation, in order to define strategies for future treatments against bulking. *Sphaerotilus natans*, which is able to grow reversibly as single-cell or filament, has been used as a model within this work.

Different types of culture experiments, as well as cFDA/SE staining and flow cytometry analysis have showed that different strains of *S. natans* have various behaviours and that filaments grow by a chain of cell divisions instead of a reassembly of single cells. RT-QPCR analysis shows that *sthA* gene expression increases strongly after induction of filamentation and then stays at high level. LC-MS-MS analysis of protein expression from filamentous and single-cell forms of *S. natans* allows the identification of enzymes involved in filamentation and especially in sheath synthesis.

Intracellular rRNA concentration, measured by RT-QPCR, varies strongly during *S. natans* and other microorganism growth, leading to an important decrease in the FISH signal intensity, measured by flow cytometry. The efficiency of bacterial quantification using FISH, especially in complex matrix such as activated sludge is therefore questioned. The hypothesis of filament lysis when growth conditions return to normal, deduced from FISH quantification, is also weakened.

Keywords: filamentous bacteria, *Sphaerotilus natans*, activated sludge, bulking, filamentation mechanisms, proteomic, rRNA, FISH, RT-QPCR, LC-MS-MS, flow cytometry

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN codant
ADNr	ADN ribosomique
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C/N	Ratio Carbone/Azote
CARD FISH	CAtalysed Reporter Deposition FISH
cF	5-(6)-carboxyfluorescéine
cF/SE	5-(6)-carboxyfluorescéine succinimidyl ester
cFDA	5-(6)-carboxyfluorescéine diacétate
cFDA/SE	5-(6)-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester
Cm	Charge massique
CMF	Cytométrie en flux
CRT	Chlore Résiduel Total
Ct	Cycle threshold
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DAPI	Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate
DBO	Demande biochimique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
D-HPLC	Denaturing High Performance liquid Chromatography
dNTP	Désoxyribonucléotide
DO	Densité optique
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
EH	Equivalent habitant
EPS	Exopolysaccharide ou exopolymeric substances
ERU	Eaux résiduaires urbaines
ESI	Electrospray Ionisation
FISH	Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization
FITC	Fluorescéine isothiocyanate-5
FNDAE	Fonds National pour le Développement des Adductions d'Eau
FP	Forward primer

FSC	forward angle light scatter
Fts	Filamentous thermo-sensitive
GFP	Green fluorescent protein
Hsp	Heat Shock Protein
IB	Indice de boue
ITS	Intergenic Transcribed Spacer
LC-MS-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LSU	Large Subunit
MES	Matières en suspension
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MS-MS	Spectrométrie de Masse en Tandem
MVS	Matières volatiles sèches
NB	Nutrient Broth
NTC	No Template Control
NTK	Azote Kjeldahl
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline ou tampon phosphate salin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Phosphoénol-pyruvate
PEPCK	Phosphoénol-pyruvate carboxykinase
pH	Potentiel hydrogène
PHB	Polyhydroxybutyrate
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
POP	Polluants Organiques Permanents
QPCR	PCR quantitative en temps réel
RP	Reverse primer
rpm	Rotations par minute
RT-QPCR	Reverse transcriptase quantitative PCR
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSB	SDS Sample Buffer
SSC	Side angle light scatter
SSU	Small Subunit
SVI	Sludge volume index
TEMED	NNN'N'-tétra-méthyl-éthylénédiamine
Tm	Melting temperature
T-RFLP	Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism
Tris	Tris-hydroxyméthylaminométhane
TTGE	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis

Sommaire

AVANT-PROPOS	21
CHAPITRE 1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
1. ÉPURATION DES EAUX USEES	27
1.1 GÉNÉRALITÉS	27
1.1.1 <i>La pollution des eaux usées.....</i>	28
1.1.2 <i>Les paramètres de caractérisation du degré de pollution des effluents</i>	29
1.1.3 <i>Les influents de stations d'épuration</i>	30
1.1.4 <i>La nécessité de l'épuration.....</i>	31
1.1.5 <i>Les différents niveaux de traitement et les différents procédés d'épuration.....</i>	32
1.2 L'ÉPURATION BIOLOGIQUE DES EAUX USEES PAR BOUES ACTIVEES.....	35
1.2.1 <i>Définition des boues activées</i>	35
1.2.2 <i>Principe de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées</i>	37
1.2.3 <i>Principaux paramètres de fonctionnement.....</i>	38
1.2.4 <i>Avantages et inconvénients de l'épuration par boues activée</i>	39
1.3 PROBLÈMES DE FONCTIONNEMENT LIÉS AUX BACTÉRIES FILAMENTEUSES	40
1.3.1 <i>Les mousses biologiques ou foaming</i>	40
1.3.2 <i>Le foisonnement filamenteux ou bulking</i>	41
1.3.3 <i>Caractérisation du foisonnement filamenteux.....</i>	42
1.3.4 <i>Les facteurs inducteurs du foisonnement filamenteux.....</i>	44
1.3.5 <i>Les moyens curatifs et préventifs des épisodes de foisonnement filamenteux et de moussage</i>	47
2. LES BACTÉRIES FILAMENTEUSES DES BOUES ACTIVEES	48
2.1 RÔLE DES BACTÉRIES FILAMENTEUSES DANS LES BOUES ACTIVEES	49
2.2 PRINCIPALES BACTÉRIES FILAMENTEUSES.....	49
2.2.1 <i>Microthrix parvicella :</i>	49
2.2.2 <i>Type 0581 :.....</i>	50

2.2.3	<i>Thiothrix</i> :.....	50
2.2.4	<i>Eikelboom</i> type 021N ou <i>Thiothrix eikelboomii</i> :.....	51
2.2.5	<i>Nostocoïda limicola</i> :.....	51
2.2.6	Type 0041 et Type 0675 :.....	52
2.2.7	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i> :.....	52
2.2.8	Type 0092 :.....	53
2.2.9	Type 0961 :.....	53
2.2.10	<i>Sphaerotilus natans</i>	53
2.2.11	Autres.....	54
3.	NOTRE BACTERIE MODELE : <i>SPHAEROTILUS NATANS</i>.....	54
3.1	MORPHOLOGIE.....	54
3.2	PHYLOGENIE.....	56
3.3	PHYSIOLOGIE GENERALE.....	57
3.3.1	<i>Sources de carbone et d'énergie.....</i>	57
3.3.2	<i>Sources d'azote.....</i>	58
3.3.3	<i>Température.....</i>	58
3.3.4	<i>pH.....</i>	58
3.3.5	<i>Besoins en oxygène.....</i>	58
3.4	LES DIFFERENTES CONTRIBUTIONS DE <i>S. NATANS</i>.....	58
3.4.1	<i>Contributions à l'épuration et à la dépollution des eaux.....</i>	58
3.4.2	<i>Contributions éventuelles à la médecine.....</i>	59
3.5	DIMORPHISME DE <i>S. NATANS</i> :.....	59
3.5.1	<i>En cultures pures.....</i>	59
3.5.2	<i>En boues activées.....</i>	61
3.6	LA GAINE DE <i>S. NATANS</i>.....	63
3.6.1	<i>Mise en évidence et observation de la gaine de <i>S. natans</i>.....</i>	63
3.6.2	<i>Composition et structure de la gaine de <i>S. natans</i>.....</i>	64

3.6.3	<i>Dégradation de la gaine</i>	65
3.7	LES POLYSACCHARIDES EXTRACELLULAIRES PRODUITS PAR <i>S. NATANS</i>	67
3.7.1	<i>Structure et composition</i>	67
3.7.2	<i>Rôle et dégradation du polysaccharide</i>	67
3.8	IDENTIFICATION D'UN GENE ESSENTIEL A LA FILAMENTATION CHEZ <i>S. NATANS</i>	68
3.8.1	<i>Identification du gène sthA</i>	68
3.8.2	<i>Comparaison morphologique des mutants-sthA et des souches sauvages de <i>S. natans</i></i>	69
3.8.3	<i>Expression du gène sthA</i>	70
4.	DETECTION, IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES MICROORGANISMES FILAMENTEUX	71
4.1	METHODE D'IDENTIFICATION CLASSIQUE : OBSERVATION MICROSCOPIQUE	71
4.2	METHODES D'IDENTIFICATION MOLECULAIRES	72
4.2.1	<i>PCR et QPCR</i>	73
4.2.2	<i>Clonage d'ARNr 16S</i>	73
4.2.3	<i>FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)</i>	74
4.2.4	<i>Techniques d'empreintes génétiques</i>	77
4.2.5	<i>Analyses par Microarray ou puce à ADN</i>	81
5.	CONCLUSION	82
	CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES	85
1.	TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE	87
1.1	SOUCHES UTILISEES	87
1.1.1	<i>Sphaerotilus natans</i>	87
1.1.2	<i>Sphaerotilus natans Roxane</i>	87
1.1.3	<i>Leptothrix</i>	87
1.1.4	<i>Autres Microorganismes</i>	88
1.2	CULTURES DES MICROORGANISMES	88
1.2.1	<i>Milieux et conditions de culture</i>	88

1.2.2	<i>Culture en Bioréacteurs</i>	92
1.3	ISOLEMENT PAR MICROMANIPULATION	93
2.	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	95
2.1	EXTRACTION D'ACIDES NUCLEIQUES	95
2.1.1	<i>ADN</i>	95
2.1.2	<i>ARN</i>	97
2.1.3	<i>Dosage des acides nucléiques</i>	101
2.2	REACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE (RT)	102
2.3	PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) ET QPCR (PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL)	103
2.3.1	<i>Principe</i>	103
2.3.2	<i>Protocole de PCR</i>	107
2.3.3	<i>Protocole de QPCR</i>	108
2.3.4	<i>Quantification relative, méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$</i>	109
2.3.5	<i>Amorces</i>	110
2.4	FISH	113
2.4.1	<i>Protocoles</i>	113
2.4.2	<i>Sondes utilisées</i>	117
2.5	CLONAGE	117
3.	CYTOMETRIE EN FLUX	119
3.1	PRINCIPE	119
3.2	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	120
3.2.1	<i>Marquage cFDA</i>	120
3.2.2	<i>Analyses FISH par cytométrie en flux</i>	122
4.	MARQUAGE CFDA/SE : SUIVI DE DIVISION CELLULAIRE.	122
4.1	DESCRIPTION	122
4.2	PROTOCOLE DE MARQUAGE	123

4.3	OBSERVATION ET ACQUISITION DES IMAGES	123
5.	PROTEOMIQUE	124
5.1	EXTRACTION DES PROTEINES	124
5.2	DOSAGE DES PROTEINES	125
5.3	ANALYSES SDS PAGE (SODIUM DODECYL SULFATE POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS).	125
5.4	ANALYSES PROTEIQUES PAR LC-MS/MS	128
5.4.1	<i>Présentation de la technique de LC-MS-MS</i>	<i>128</i>
5.4.2	<i>Protocole expérimental et données techniques</i>	<i>135</i>
	CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS	139
1.	ÉTUDE DES MECANISMES PHYSIOLOGIQUES ET MOLECULAIRES DE LA FILAMENTATION CHEZ S. NATANS	141
1.1	ISOLEMENT PAR MICROMANIPULATION D'UNE SOUCHE DE S. NATANS A PARTIR DE BOUES ACTIVEES	142
1.1.1	<i>Identification de l'espèce bactérienne.....</i>	<i>142</i>
1.1.2	<i>Isolement de la souche par micromanipulation</i>	<i>143</i>
1.1.3	<i>Conclusions.....</i>	<i>145</i>
1.2	COMPORTEMENT MORPHOLOGIQUE DE SPHAEROTILUS NATANS EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE	147
1.2.1	<i>Différenciation morphologique en fonction de l'état physique du milieu : agar ou bouillon.....</i>	<i>147</i>
1.2.2	<i>Orientation morphologique en fonction de la concentration en nutriments du milieu de culture</i>	<i>149</i>
1.2.3	<i>Étude des transitions morphologiques pour différentes souches de S. natans</i>	<i>153</i>
1.2.4	<i>Conclusions.....</i>	<i>158</i>
1.3	DETERMINATION DU MODE D'ALLONGEMENT DES FILAMENTS DE S. NATANS	163
1.3.1	<i>Étude de l'évolution des classes de taille lors du phénomène de filamentation par cytométrie en flux</i>	<i>164</i>
1.3.2	<i>Effet de l'inhibition de la division cellulaire par une carence en azote.....</i>	<i>168</i>
1.3.3	<i>Croissance en présence d'un inhibiteur spécifique de la division cellulaire : l'acide nalidixique</i>	<i>172</i>
1.3.4	<i>Conclusion.....</i>	<i>174</i>

1.4	ÉTUDE DU GENE STHA	177
1.4.1	<i>Création d'amorces spécifique du gène sthA.....</i>	177
1.4.2	<i>Détermination de la séquence du gène sthA pour les différentes souches de S. natans</i>	182
1.4.3	<i>Étude de l'expression du gène sthA en fonction de la morphologie adoptée par S. natans par RT-PCR quantitative en temps réel</i>	187
1.4.4	<i>Utilisation des amorces sthA pour la quantification de S. natans en boues activées</i>	195
1.5	ÉTUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE DES FORMES MONOCELLULAIRE ET FILAMENTEUSE DE S. NATANS	209
1.5.1	<i>Étude du polysaccharide de la gaine de S. natans</i>	209
1.5.2	<i>SDS-PAGE</i>	210
1.5.3	<i>Analyse LC-MS-MS.....</i>	213
1.5.4	<i>Conclusions, limitations de la technique et perspectives</i>	223
2.	VARIATION DU SIGNAL FISH AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE	227
2.1	ÉVOLUTION DE L'INTENSITE DU SIGNAL FISH LORS DU CYCLE DE CROISSANCE	230
2.1.1	<i>Sphaerotilus natans.....</i>	230
2.1.2	<i>Lactobacillus delbruekii.....</i>	234
2.1.3	<i>Saccharomyces cerevisiae.....</i>	236
2.2	ÉTUDE DE LA VARIATION DE LA QUANTITE D'ARN RIBOSOMIQUES INTRACELLULAIRES AU COURS DE LA CROISSANCE DES MICROORGANISMES.....	242
2.2.1	<i>Sphaerotilus natans 29330.....</i>	243
2.2.2	<i>Lactobacillus delbruekii.....</i>	245
2.2.3	<i>Saccharomyces cerevisiae.....</i>	247
2.2.4	<i>Conclusion.....</i>	249
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	253
	1 - PHYSIOLOGIE DE LA FILAMENTATION	255
	2 - MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LA FILAMENTATION.....	257
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	261
	ANNEXES	275

Avant-propos

Après avoir longtemps pensé que les ressources que la nature lui offrait étaient inépuisables, l'homme prend aujourd'hui douloureusement conscience qu'il n'en est rien. Si les dégâts qu'il a fait subir à son environnement ne sont pas tous irréversibles, il faudra cependant de très longues années avant de pouvoir les réparer. Élément essentiel à la vie, l'eau se situe au cœur de ces préoccupations. Depuis toujours, cette ressource joue un rôle central dans la vie de l'homme, aussi bien pour satisfaire ses besoins physiologiques, que pour l'agriculture, l'élevage, l'artisanat, l'industrie, ou encore pour son simple confort.

L'eau salée représente 97% des eaux à la surface de la Terre, 2% correspondent à l'eau douce sous forme de glace, l'eau douce liquide ne représente que 1%. Cette dernière est pourtant un élément vital pour la plupart des espèces animales et végétales. Mais si la quantité globale d'eau douce disponible sur l'ensemble de la planète est importante, son accès n'est pas équitable pour tous les hommes. Près d'un quart de la population mondiale n'a pas accès à une eau potable de bonne qualité. On note des disparités très marquées entre Nord et Sud, les pays aux ressources en eau douce les plus limitées étant pour la plupart des pays en voie de développement. Cette situation est de plus aggravée par le fait que ces régions voient leur population s'accroître de façon très importante, accentuant encore leurs besoins. Ces différents éléments laissent entrevoir des perspectives de pénurie d'ici quelques dizaines d'années.

L'homme est donc en train de comprendre qu'il doit économiser et protéger les ressources en eau. Les lacs, les fleuves et rivières sont un réservoir majeur d'eau douce, et constituent également le siège de tout un écosystème foisonnant de vie, aussi bien animale que végétale.

Au cours du siècle dernier, les progrès techniques de nos sociétés modernes ont permis à tous d'accéder à l'eau facilement, augmentant de façon considérable et souvent excessive, sa consommation, et donc la quantité d'eaux usées rejetées. Pendant longtemps, les eaux usées domestiques et industrielles étaient rejetées directement dans les cours d'eau et les capacités d'autoépuration des milieux aquatiques permettaient d'éliminer la pollution. Mais avec

l'accroissement de la population et le développement des industries, les rejets ont très vite dépassé les capacités épuratrices de la nature. Après avoir pris conscience que par de telles pratiques il dégradait son habitat, l'homme a donc compris qu'il lui fallait collecter les eaux usées et les débarrasser au maximum de leur pollution avant de la rejeter dans le milieu naturel. Ainsi naquit l'épuration.

Le procédé d'épuration par les boues activées est actuellement le plus répandu dans le domaine du traitement des eaux usées. Cette méthode qui a vu le jour au début du 20^{ème} siècle, est basée sur l'utilisation de la capacité des microorganismes à dégrader la matière organique. Les eaux usées sont mises en présence des microorganismes contenus dans les boues, et d'une source d'oxygène, pendant une certaine période. Après décantation des boues, l'eau épurée est rejetée vers le milieu naturel. Bien que ne permettant pas de rejeter dans le milieu une eau complètement dépolluée, l'épuration par boues activées représente le meilleur compromis entre la qualité de l'effluent rejeté et le coût du traitement.

Si ce procédé est globalement bien maîtrisé, l'utilisation de matériel biologique vivant implique que certains paramètres soient difficiles à maîtriser. Ainsi dans certains cas, les boues vont subir des épisodes de foisonnement filamenteux, aussi appelés bulking. Ce problème fait partie des désordres les plus fréquemment rencontrés dans les stations d'épuration à boues activées, puisqu'il touche près de 25% des installations. Cela se traduit par une augmentation du volume des boues et une importante altération de leur capacité de décantation. Les boues ne pouvant plus sédimenter correctement, elles vont être rejetées avec l'eau épurée et contaminer le milieu naturel avec de la matière organique et des bactéries. Des pertes massives de boues peuvent donc perturber gravement l'équilibre écologique du cours d'eau récepteur, pouvant conduire dans les cas les plus graves à une eutrophisation du milieu.

À partir du début des années 80, des normes de rejets ont été instaurées pour les stations d'épuration. Des concentrations maximales ont ainsi été fixées pour les matières en suspension et les substances azotées et phosphorées, qui sont les principales substances polluantes contenues dans les boues activées. De ce fait, les stations subissant un épisode de foisonnement filamenteux vont être contraintes soit de diminuer leur débit d'influent afin de maintenir une qualité de l'effluent constante, soit interrompre totalement leurs rejets et donc leur fonctionnement, entraînant d'importantes conséquences d'ordre économique. La maîtrise de la phase de décantation des boues est donc essentielle pour la préservation du milieu récepteur, mais également pour assurer une gestion efficace de la station d'épuration.

Le foisonnement filamentueux a été l'objet de nombreuses études au cours des trente dernières années. Une des premières étapes a été l'identification des microorganismes responsables de ce type de dysfonctionnement. Eikelboom (1975) a ainsi défini une méthode basée sur l'utilisation de critères morphologiques. L'avènement de la biologie moléculaire a ensuite fourni de nouveaux outils aux microbiologistes, et en particulier l'hybridation *in situ* (Amann *et al.*, 1990), qui permet une identification plus efficace des microorganismes. Parallèlement, des investigations ont permis de déterminer les facteurs induisant la prolifération excessive de ces microorganismes : les carences en oxygène, en nutriments, un faible ratio substrat/microorganismes, un déséquilibre C/N, ou une mauvaise configuration de la station.

Si ce phénomène est maintenant mieux cerné par les chercheurs, les moyens permettant d'y mettre fin après sa survenue restent limités à un traitement des boues par chloration. Cette méthode est efficace, mais très agressive pour l'ensemble des microorganismes présents au sein de l'écosystème. Mais à l'heure actuelle il n'existe aucun moyen de lutte ciblant spécifiquement les bactéries filamenteuses. Ceci est en grande partie dû au fait que ces microorganismes particuliers soient encore mal connus. Un certain nombre de ces bactéries existent également sous forme monocellulaire, mais les mécanismes guidant le passage d'une forme de croissance à l'autre sont encore inconnus.

Le principal objectif de ces travaux a donc été de préciser les mécanismes moléculaires et physiologiques conduisant à la croissance en culture pure d'une bactérie filamenteuse modèle, *Sphaerotilus natans*, en utilisant des techniques de microbiologie classiques, de biologie moléculaire, de biochimie et de protéomique.

Concernant l'aspect physiologique et moléculaire de la filamentation, un certain nombre d'interrogations ont guidé ce travail :

- Quels sont les impacts des caractéristiques du milieu de culture, en l'occurrence la concentration en nutriments et de l'état physique, sur la morphologie adoptée par *S. natans* ?
- Les différentes souches de *S. natans* adoptent-elles les mêmes comportements face à ces différentes conditions de culture ?
- Quels est le mode d'allongement du filament : une agrégation de cellules dispersées ou une succession de divisions cellulaires ?

- Quelles sont les mécanismes et les acteurs moléculaires (enzymes, protéines de structure, polysaccharides, etc.) impliqués dans la formation du filament ?
- Comment varie leur expression en fonction de la morphologie adoptée ?

Ces travaux ont également nécessité la définition d'un protocole de quantification de *S. natans*, aussi bien sous forme dispersée que filamenteuse, en boues activées, par PCR quantitative en temps réel.

L'hypothèse d'une défilamentation (Gaval, 2001) avait été émise suite à l'observation de la disparition rapide des filaments par la technique FISH, lors d'un retour à des conditions de culture favorables pour le microorganisme. Un autre volet de ce travail a été d'évaluer les variations d'intensité de signal obtenu par hybridation fluorescente *in situ* au cours de la croissance des microorganismes afin de déterminer si ce phénomène résulte d'un artefact de la quantification des filaments par la technique FISH.

La compréhension des mécanismes de filamentation devrait permettre à terme de développer des moyens de lutte contre le foisonnement filamenteux, aussi bien préventifs que curatifs, ciblant spécifiquement les microorganismes incriminés dans les stations d'épuration à boues activées.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

1. Épuration des eaux usées

1.1 Généralités

Au cours des deux derniers siècles, l'industrialisation et l'urbanisation associées à une importante poussée démographique, ont conduit à une augmentation de la production de déchets, et en particulier des eaux usées. Jusqu'à la fin du XIX^{ème} siècle, les eaux usées étaient directement rejetées dans le milieu naturel, dans des champs d'épandage ou directement dans les cours d'eau. Mais les capacités d'auto-épuration du milieu naturel restent insuffisantes pour traiter la pollution produite par l'homme. Dans le Paris du Moyen-âge, l'évacuation des eaux se résume à "un tout à la rue" ! Les rues sont sales et souillées d'immondices et de déjections. Ceci va provoquer l'apparition de nombreuses vagues d'épidémies (choléra, dysenterie, coqueluche, peste). Sous le règne de Louis XIV, les autorités commencent à se préoccuper des questions d'hygiène mais la situation évolue très peu. Les premiers "égouts" apparaissent, mais ils se résument à des rigoles qui fendent la rue en son milieu. L'eau s'y écoule selon la pente et est rejetée dans la Seine. Ce n'est qu'en 1860 qu'apparaît réellement le réseau d'égout sous l'impulsion d'Hausmann et Belgrand. Mais là encore ce réseau aboutit à la Seine. Les rues sont alors plus propres, on se contente simplement de rejeter les eaux usées loin du centre ville. De ce fait, la pollution se concentre là où les égouts la transportent. En 1868 les premiers champs d'épandage expérimentaux voient le jour à Clichy. Les hommes ont compris que les eaux usées ne doivent pas être directement rejetées dans le milieu naturel sous peine de l'altérer gravement. Les scientifiques pensent alors à traiter ces effluents. C'est alors que les concepts de lits bactériens immergés (1895) et de boues activées (1914) voient le jour. En effet, grâce au développement des connaissances en microbiologie, les hommes comprennent que les micro-organismes sont responsables de la dégradation de la matière organique. Ils imaginent alors utiliser ces propriétés des microorganismes afin de pouvoir rejeter les effluents dans le milieu naturel sans conséquences néfastes. Les premières stations d'épuration apparaissent au début du 20^{ème} siècle. Au fil des années, la compréhension des mécanismes épuratoires s'est améliorée et s'est perfectionnée, c'est ainsi que sont apparues dans les années 50 des techniques de traitement de l'azote, puis du phosphore dans les années 70. Mais ces installations sont surtout mises en place pour des agglomérations de taille importante. En France en 1962, seulement 12 % des habitations étaient reliées au système de tout à l'égout. Il y a encore 20 à 30 ans, la plupart des eaux usées domestiques ou industrielles étaient rejetées telles quelles dans les cours d'eau.

1.1.1 La pollution des eaux usées

On distingue différents types de pollutions dans les eaux usées dont les principaux sont de nature organique et minérale.

1.1.1.1 La pollution organique

Elle provient essentiellement du déversement dans le réseau collecteur des égouts urbains et particuliers. Elle est d'origine animale (déjections humaines, effluents d'élevage) ou végétale. Les matières organiques sont en grande partie (70%) biodégradables, c'est-à-dire qu'elles sont dégradées par des micro-organismes qui les utilisent comme source de carbone lors de leur croissance.

1.1.1.2 La pollution minérale

Les principales sources de pollution minérale sont l'azote et le phosphore. L'azote provient en grande partie de déjections humaines mais également des effluents d'élevage (Maurines-Carboneill *et al.* 1998). La pollution par l'azote issue de l'agriculture (nitrate) est très importante, mais elle n'affecte que très peu les effluents de stations d'épuration et passe directement dans le milieu récepteur (fleuves, rivières et nappes phréatiques). L'azote se retrouve sous forme d'ammoniaque (NH_4^+), de nitrite (NO_2^-) et de nitrate (NO_3^-)

Les phosphates proviennent également des déjections humaines, mais également des détergents et lessives. Ils sont sous forme d'orthophosphates (PO_4^{3-}) et de polyphosphates.

La présence de ces sels minéraux dans le milieu naturel, qu'ils soient issus des rejets d'eaux usées ou de l'agriculture, va avoir comme principale conséquence l'eutrophisation. Ils sont en effet facilement assimilables par les végétaux qui vont donc proliférer de façon excessive. Ce phénomène peut aboutir à un important déséquilibre de l'écosystème aquatique en quelques décennies ou même quelques années.

1.1.1.3 Autres types de pollution

La **pollution chimique** : ce type de pollution est engendré par des rejets de produits chimiques à la fois d'origine industrielle et domestique. Ces polluants peuvent être classés en de deux catégories :

- Les micropolluants chimiques organiques : (hydrocarbures, pesticides, détergents, autres...)

Ils sont appelés polluants organiques permanents (POP).

- Les micropolluants chimiques inorganiques : principalement les métaux lourds (Cuivre, Zinc, Cadmium, Plomb, Mercure et Nickel)

Le danger de ces polluants dépend de leur nature biochimique. Certains sont hydrosolubles et fortement dilués. Leur action est donc minime. D'autres sont liposolubles avec le pouvoir de se concentrer au niveau des lipides. Par conséquent, ils vont s'accumuler le long de la chaîne trophique. Il y a d'autres polluants ayant un pouvoir contaminant plus nuisible, il s'agit des molécules qui échappent à la dégradation, elles sont appelées réfractaires.

La **pollution physique** : C'est une pollution due aux décharges des déchets et aux particules en suspension (MES) apportés par les eaux de ruissellement et les eaux d'égouts. Elle provient aussi des opérations de dragage, de l'érosion, du sablage des routes, de l'exploitation des carrières. Les polluants solides rejetés dans le milieu aquatique peuvent être répartis en trois catégories : les boues, les solides flottants et les ordures ménagères.

La **pollution biologique** : les eaux résiduaires urbaines transportent de nombreux micro-organismes : virus, bactéries, protozoaires, et helminthes (embranchement de vers parasites). Cette pollution peut être dangereuse en cas de présence de micro-organismes pathogènes.

1.1.2 Les paramètres de caractérisation du degré de pollution des effluents

La pollution, et en particulier la pollution d'origine organique, se présente sous des formes très variées. Pour caractériser les effluents de stations d'épuration, on utilise donc des paramètres globaux dont les principaux sont décrits dans ce qui suit.

La **demande biochimique en oxygène (DBO)** désigne la quantité d'oxygène consommée (mg.L^{-1}) par voie biologique pendant un temps déterminé à une température donnée pour décomposer par oxydation cette matière organique. On considère en général la consommation d'oxygène en 5 jours à 20°C (**DBO₅**).

La **DCO** ou **demande chimique en oxygène** (en mg.L^{-1}) correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder par voie chimique l'ensemble des matières oxydables présentes dans un échantillon d'eau de 1 litre. Elle est moins représentative que la DBO de la décomposition des matières organiques qui a lieu dans le milieu naturel, mais elle est rapide à mesurer, et possède une bonne reproductibilité.

La **charge** de pollution est également un paramètre important à prendre en compte. Elle correspond à la quantité de pollution transitant pendant un temps défini (un jour en général), dans le réseau et reçue par la station d'épuration.

Les **matières en suspension** (MES) désignent l'ensemble des matières solides contenues dans une eau et pouvant être retenues par filtration ou centrifugation.

Les **concentrations en nutriments** correspondent aux concentrations des différentes formes de l'azote (NTK, NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) et aux concentrations en phosphate (PO_4^{3-}).

1.1.3 Les influents de stations d'épuration

1.1.3.1 Les eaux résiduaires urbaines

L'origine des eaux résiduaires urbaines est principalement domestique. Elles comprennent les eaux ménagères et eaux vannes issues des maisons et services, ainsi que les eaux pluviales. En France, les quantités d'ERU produites pour des villes de quelques milliers d'habitants varient de 200 L/habitant/jour par temps sec, à 300 L/habitant/jour par temps de pluie où les eaux de lavage des surfaces imperméabilisées sont importantes. Les rejets domestiques présentent généralement des caractéristiques peu variables (cf. Tableau1).

Paramètres	Échelle de variation
pH	7,5 à 8,5
Extrait sec mg.L ⁻¹	1000 à 2000
MES totales mg.L ⁻¹	150 à 500
DBO ₅ mg.L ⁻¹	100 à 400
DCO mg.L ⁻¹	300 à 1000
COT mg.L ⁻¹	100 à 300
NTK mg.L ⁻¹	30 à 100
N-NH ₄ ⁺ mg.L ⁻¹	20 à 80
N-NO ₂ ⁻ mg.L ⁻¹	<1
N-NO ₃ ⁻ mg.L ⁻¹	<1
Détergents mg.L ⁻¹	6 à 13
P mg.L ⁻¹	10 à 25

Tableau 1 : Caractéristiques des ERU françaises (Degrémont, 1989)

1.1.3.2 Les eaux résiduaires industrielles

Les établissements industriels rejettent une pollution excédant le plus souvent les capacités des stations de traitement des ERU, ou nécessitant un traitement spécifique (traitement chimique supplémentaire par exemple). Ils sont donc en général équipés d'un système d'épuration autonome. L'effluent industriel est ensuite soit directement rejeté dans le milieu naturel, soit dans des égouts urbains aboutissant à des stations biologiques dont ils ne doivent pas perturber le fonctionnement.

Dans ce cas les caractéristiques de l'effluent sont extrêmement variables en fonction du type d'industrie : agro-alimentaire, papeteries, industries du pétrole et de la chimie, sidérurgie, aéronautique et automobile, des traitements de surfaces, textiles, centrales nucléaires, etc.

1.1.4 La nécessité de l'épuration

Quand les eaux usées, urbaines ou industrielles, ne sont pas épurées avant leur rejet dans le milieu naturel, l'altération de ce dernier et les déséquilibres qui s'y produisent ont non seulement des effets immédiats sur les utilisations de l'eau, mais aussi des conséquences à plus long terme et parfois irréversibles sur l'environnement. Les caractéristiques des stations d'épuration doivent être telles que l'effluent rejeté n'altère pas l'état du milieu récepteur dans une mesure incompatible avec les exigences d'hygiène et de salubrité publique.

La directive n° 91/271 du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires urbaines (JOCE n° L 135/40 du 30 mai 1991) a fixé des prescriptions relatives aux rejets provenant des stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines (cf. Tableau 2).

Paramètres	Concentration	Pourcentage minimal de réduction ^a
DBO₅ sans nitrification	25 mg/L	70-90
DCO	125 mg/L	75
Total des MES	35 mg/L (plus de 10 000 EH). 60 (2000 à 10 000 EH)	90 (plus de 10 000 EH) 70 (de 2000 à 10 000 EH)
Phosphore total	2 mg/L (de 10 000 à 100 000 EH) 1 mg/L (plus de 100 000 EH)	80
Azote total^b	15 mg/L (de 10 000 à 100 000 EH°) 10 mg/L (plus de 100 000 EH)	70-80

Tableau 2 : Prescriptions relatives aux rejets provenant des stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines (Directive (CEE) n° 91/271 du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux résiduaires urbaines)

1.1.5 Les différents niveaux de traitement et les différents procédés d'épuration.

1.1.5.1 Les prétraitements

Ces traitements se trouvent en tête de station d'épuration et permettent de retenir les matières les plus volumineuses (dégrillage), les sables (dessablage), ainsi que les huiles et graisses difficilement biodégradables (écumage et déshuilage). Les prétraitements assurent une fonction de protection des canalisations et des installations mécaniques telles que les pompes.

1.1.5.2 Les traitements primaires

La décantation est le procédé de traitement primaire le plus répandu. Dans les décanteurs primaires raclés actuels, les boues décantées sont ramenées au centre du bassin (décanteur

^a Réduction par rapport aux valeurs à l'entrée

^b L'azote total correspond à l'azote dosé par la méthode de Kjeldahl (azote organique et ammoniacal), et à l'azote contenu dans les nitrates et dans les nitrites.

circulaire) tandis qu'une lame en surface rejette les éléments flottants vers les bords. Ces traitements permettent d'éliminer 60 % des MES ainsi que 35 à 40 % de la D.B.O.₅ des eaux résiduaires.

1.1.5.3 Les traitements physico-chimiques

Les filières physico-chimiques utilisent des moyens physiques (décantation, flottation, filtres et membranes) et/ou des produits chimiques, notamment des agents coagulants (Chlorure ferrique, Sulfate d'aluminium...) et des flocculants.

Ces filières ne représentent qu'une centaine d'unités sur le parc des stations d'épuration urbaines françaises. Elles sont particulièrement adaptées aux contextes touristiques saisonniers où les variations de charge peuvent être très brutales sur une courte période. Elles peuvent également être adaptées au traitement d'effluents industriels particuliers. Ces stations se présentent le plus souvent sous forme d'installations plutôt compactes. Elles permettent une très bonne élimination des MES (90 %) et du phosphore, et sont insensibles à la non-biodégradabilité des effluents. Par contre l'élimination de la pollution dissoute organique et azotée y est très incomplète. Ces traitements engendrent des masses importantes de boue. Il faut également noter que le coût d'exploitation de ce type de station est très élevé.

Dans l'état actuel des technologies, les membranes de microfiltration et nanofiltration sont encore majoritairement réservées à la potabilisation de l'eau, et peu à l'épuration.

1.1.5.4 Les traitements biologiques

On utilise ici les propriétés épuratrices des microorganismes et notamment des bactéries. Les eaux usées constituent d'excellents milieux de culture, dans lesquelles un apport d'oxygène suffit pour obtenir un intense développement de microorganismes. Ces eaux sont donc très facilement biodégradables. La majeure partie de la matière organique dissoute est ainsi transformée en biomasse que l'on va ensuite recueillir par décantation sous forme de boue. Ces filières permettent également de traiter l'Azote (N) et le Phosphore (P) dans les eaux usées.

Il existe différents types de traitements biologiques.

1.1.5.4.1 Les procédés à cultures fixées

✓ **Les lits bactériens et disques biologiques**

Dans le procédé à **lits bactériens**, les eaux usées préalablement décantées ruissellent sur une masse de matériaux poreux ou caverneux qui sert de support au développement de microorganismes. Une aération apporte l'oxygène nécessaire au maintien des bactéries.

Dans le cas des **disques biologiques**, des disques de polystyrène de 2 à 3 mètres de diamètre sont partiellement immergés dans un bassin recevant l'eau usée, préalablement décantée. Fixés sur un axe, ils sont mis en rotation à vitesse lente de 1 à 2 rpm. Sur ces disques se développe alors un film bactérien. Lors de leur émergence, les bactéries prélèvent l'oxygène nécessaire à leur respiration et lors de l'immersion, elles transforment la pollution dissoute.

✓ *Filtration biologique ou Biofiltration*

Ce traitement consiste à faire transiter les eaux usées, préalablement décantées, dans un bassin contenant un matériau filtrant immergé, servant de support au développement d'un film biologique. Ce dernier va permettre l'assimilation de la pollution et la filtration de la boue produite d'où le terme "biofiltre". Ce type de procédé donne d'excellents résultats et permet d'obtenir une nitrification quasi-complète.

Il existe également des systèmes épuratoires où les filtres sont des excavations, étanchées du sol, et remplies de couches successives de gravier et de sable. La surface de ce massif est également plantée de roseaux ou macrophytes. On parle de **filtres plantés de roseaux**. Au sein de ce massif, l'influent subit un traitement physique (filtration, adsorption), chimique (complexation) et biologique par la biomasse fixée sur le support fin.

1.1.5.4.2 Les procédés à culture libres

✓ *Lagunage*

L'épuration est assurée grâce à un long temps de séjour, dans plusieurs bassins étanches disposés en série. Le nombre de bassins varie de 3 à 6, ce qui permet d'avoir un assainissement plus poussé. L'aération du lagunage est assurée par la photosynthèse et le vent de surface. La tranche d'eau supérieure des bassins est exposée à la lumière. Ceci permet aux

algues présentes dans le bassin de produire l'oxygène nécessaire au développement et au maintien des bactéries aérobies responsables de la dégradation de la matière organique. Le gaz carbonique qu'elles produisent et les minéraux des eaux usées permettent le développement des algues. Il y a ainsi prolifération de deux populations interdépendantes. Ce cycle s'auto-entretient tant que le système reçoit de l'énergie solaire et de la matière organique. Au fond du bassin où il n'y a pas de lumière, des bactéries anaérobies dégradent les sédiments issus de la décantation de la matière organique. Le passage de l'eau dans les différents bassins se fait par écoulement gravitaire. L'importante surface exposée aux UV permet d'éliminer une part des germes pathogènes.

✓ *Les boues activées*

C'est le procédé d'épuration le plus largement répandu et son principe va maintenant être abordé plus en détail.

1.2 L'épuration biologique des eaux usées par boues activées

Ce procédé de traitement des eaux usées représente 70 % des stations d'épuration en France. Il a été mis au point au début du 20^{ème} siècle par deux chercheurs anglais Arden et Lockett suite aux travaux de Fowler, qui constata que des agglomérats bactériens se forment spontanément, lors de l'aération prolongée d'une eau résiduaire urbaine. Les microorganismes vont être capables de minéraliser d'une part, et de transformer en biomasse d'autre part, les matières organiques contenues dans les eaux usées.

1.2.1 Définition des boues activées

La boue est constituée de l'ensemble "floc-eau interstitielle". Le floc désigne un agglomérat de particules diverses (animales, végétales, minérales) et de colonies bactériennes (cf. Figure 1). La taille du floc varie de 0,5 µm à plus de 1 mm.

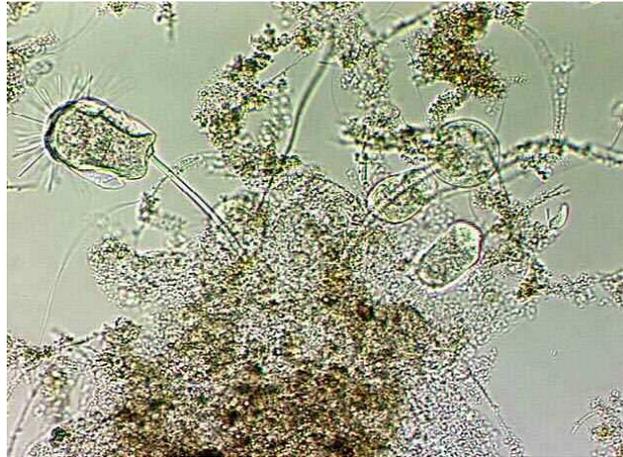


Figure 1 : Illustration de boues activées et de ses différents composants

Le **liquide interstitiel** représente le plus souvent la qualité de l'eau de sortie de la station. C'est donc un indicateur de niveau de traitement.

La "**microfaune**" se compose de protozoaires et de métazoaires. Ils participent à l'élimination des bactéries libres dont ils sont les prédateurs, et à la cohésion du floc de par leurs déjections. Leur observation au microscope peut donner des indications sur le niveau de traitement ainsi que sur d'éventuels dysfonctionnements de la station.

Les **bactéries** constituent le composant essentiel de la boue, celui qui apporte les capacités épuratrices. En se basant sur leur morphologie, on en distingue 3 types :

- ✓ Les bactéries dispersées : libres dans le liquide interstitiel. On les retrouve en général au démarrage d'une station, ou en présence d'une forte charge massique. Ces dernières peuvent rester à l'état dispersé ou former des colonies structurées par des exopolysaccharides (EPS).
- ✓ Les bactéries floculantes : elles sécrètent des exopolymères autour desquels vont s'agréger d'autres microorganismes ainsi que des particules organiques et minérales. L'ensemble formera ce que l'on appelle le floc. Ce type de croissance est particulièrement recherché dans le traitement des eaux usées.
- ✓ Les bactéries filamenteuses : lors de la division cellulaire, les cellules restent en contact, ce qui conduit à la formation de filaments pouvant atteindre jusqu'à 1 mm de long.

L'équilibre biologique optimal est établi lorsque les bactéries libres sont réduites à une densité minimale par les mécanismes de prédation par les protozoaires et métazoaires, et de floculation. Cet équilibre implique aussi que la croissance des bactéries floculantes soient favorisées par rapport à celle des bactéries filamenteuses.

1.2.2 Principe de fonctionnement d'une station d'épuration à boues activées

1.2.2.1 Prétraitements et traitements primaires :

Dans le cas du traitement par boues activées, les eaux usées arrivant dans la station vont subir les prétraitements et traitement primaire (décantation) précédemment décrits.

1.2.2.2 Traitement biologique :

La dégradation de la matière organique se déroule dans le bassin d'aération. L'eau à épurer est mise en présence de la biomasse épuratrice. Comme l'indique son nom, ce bassin possède un dispositif de fourniture d'oxygène, nécessaire aux microorganismes. Selon le type de traitement recherché, l'aération peut-être continue ou intermittente. De plus un dispositif de brassage, dans ce même bassin, va permettre d'assurer au mieux le contact entre les bactéries et la matière organique à dégrader, mais aussi d'éviter les dépôts et de favoriser l'oxygénation homogène du bassin.

1.2.2.3 Clarification ou décantation secondaire

C'est en général le dernier maillon de la chaîne de traitement de l'eau. Ici l'eau épurée est séparée de la boue par décantation gravitaire. Les boues décantées sont extraites et renvoyées vers le bassin d'aération (cf. Figure 2). C'est essentiellement sur cette phase que repose la qualité de l'eau rejetée dans le milieu naturel. En effet une altération de la décantation entraînera une perte de boue avec l'eau épurée, et donc un rejet de mauvaise qualité.

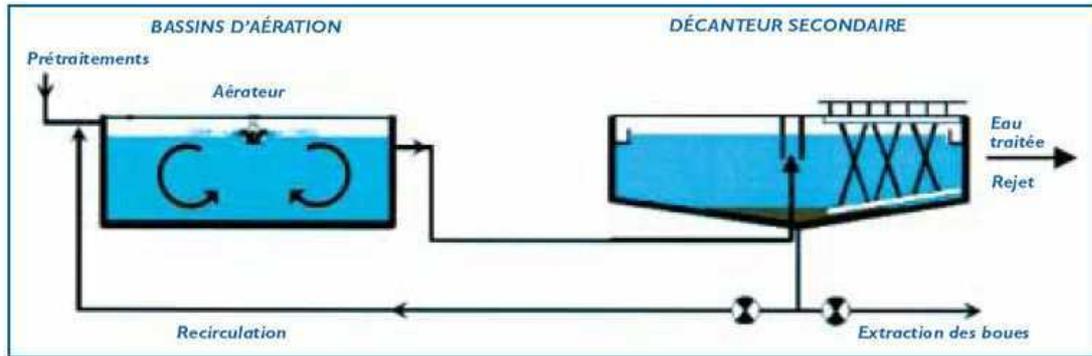


Figure 2 : Schéma du procédé de traitement des eaux usées par boues activées (d'après <http://www.carteleau.org>)

1.2.3 Principaux paramètres de fonctionnement

1.2.3.1 Charge massique

On appelle charge massique (C_m) le rapport entre la masse de substrat, généralement exprimée en terme de DBO_5 , entrant journalièrement dans le réacteur, et la masse de boue contenue dans le réacteur. On distingue ainsi les stations à forte charge ($C_m > 0,5$ kg DBO/kg MVS.j), à moyenne charge ($0,5 > C_m > 0,2$ kg $DBO :kg$ MVS.j), et à faible charge ($C_m < 0,1$ kg DBO /kg MVS.j). La C_m est définie par la formule suivante :

$$C_m = \frac{Q \cdot S_0}{X_t \cdot V}$$

avec :

Q : le débit journalier

S_0 : la concentration en substrat

X_t : la concentration en matière en suspension de la boue

V : le volume du réacteur

1.2.3.2 L'âge de boue

L'âge de boue (A) est le rapport entre la masse de boue présente dans le réacteur et la masse journalière de boue extraite de la station.

On calcule l'âge de boue grâce à la relation suivante :

$$A = \frac{1}{a_m \cdot DBO_5 \text{ éliminée} - b \cdot X_v \cdot V}$$

avec :

$a_m = 0,6 \text{ kg.j}^{-1}$ de DBO_5 pour une épuration biologique d'ERU à moyenne charge. Ce coefficient correspond à la masse de cellules formée par masse de DBO_5 éliminée

$b = 0,005 \text{ kg.j}^{-1}$ par kg de matière pour une épuration biologique d'ERU à moyenne charge. Ce coefficient correspond au besoin en oxygène relatif à la matière volatile

X_v : la concentration en matières volatiles dans le bassin d'aération

V : volume du bassin d'aération

L'âge de boue est donc inversement proportionnel à la charge massique. L'âge de boue traduit l'état physiologique des microorganismes. Il conditionne aussi la présence ou l'absence de microorganismes nitrifiants.

1.2.4 Avantages et inconvénients de l'épuration par boues activée

1.2.4.1 Avantages

La filière d'épuration par boues activées est adaptée à toutes les tailles de collectivité, à l'exception des très petites (< 1000 EH). Cette technique permet une bonne réduction des valeurs des différents paramètres de pollution (MES, DCO, DBO_5 , et N), et il est également facile de mettre en œuvre une déphosphatation simultanée. Ce procédé est bien adapté à la protection des milieux récepteurs sensibles.

1.2.4.2 Inconvénients

Les coûts d'investissements d'une station à boues activées sont élevés, et la consommation énergétique, destinée à l'alimentation des agitateurs et aérateurs, est très importante.

La gestion de ce type de station nécessite une surveillance régulière par du personnel qualifié.

Un autre point négatif du procédé d'épuration par boues activées est l'importante production de boue qu'il va falloir éliminer.

Enfin, un des principaux problèmes de ce type de station reste la maîtrise de la décantabilité des boues.

1.3 Problèmes de fonctionnement liés aux bactéries filamenteuses

Les principaux dysfonctionnements rencontrés au sein d'une station d'épuration, outre ceux liés à la maintenance des équipements, sont de nature biologique. Ces problèmes sont principalement dus aux bactéries filamenteuses et se manifestent sous deux formes : le moussage et le foisonnement filamenteux. Ces deux types de dysfonctionnement touchent près de 50 % des stations d'épuration à boues activées en France (FNDAE, 2005). Ils peuvent avoir de graves répercussions sur la qualité des effluents rejetés dans les milieux aquatiques et sur la gestion économique des stations. D'autres problèmes tels que les "pin point floes" (formation de floes de très petite taille et compacts qui sédimentent très lentement) et la dénitrification en clarificateur ne sont pas dus aux bactéries filamenteuses

1.3.1 Les mousses biologiques ou foaming

Dans ce type de dysfonctionnement, on voit apparaître de la mousse à la surface du bassin d'aération (cf. Figure 3). Ceci vient du fait que les bactéries filamenteuses se développent en grand nombre, rendent les floes hydrophobes et capables de fixer les bulles d'air. Les ensembles floc-bulle sont alors moins denses que l'eau et flottent à la surface où ils s'accumulent et forment une couche de mousse de couleur marron plus ou moins foncé.

Les mousses biologiques stables constituent un réel problème et 20 % des stations d'épuration françaises en sont affectées.



Figure 3 : Mousse biologique en surface de bassin d'aération (d'après Document technique FNDAE N° 33)

Dans certains cas extrêmes, les hauteurs de mousse peuvent dépasser un mètre, et la biomasse que l'on y trouve peut représenter un tiers de la biomasse totale. Les paramètres de fonctionnement et d'exploitation de la station sont alors fortement dégradés par cette situation.

Ce phénomène peut aussi être rencontré dans les décanteurs secondaires lors de dénitrifications non contrôlées. Cette fois ce ne seront plus des bulles d'air mais d'azote (N_2) associées aux filaments qui seront la cause du problème.

1.3.2 Le foisonnement filamenteux ou bulking

Le phénomène de foisonnement est dû à un développement filamenteux excessif. Il limite fortement les capacités hydrauliques du clarificateur, et peut entraîner des départs de boue vers le milieu naturel. En effet dans le cas d'une prolifération massive, les filaments vont avoir tendance à sortir des floccs aboutissant à un pontage des floccs entre eux (cf. Figure 4). Ceci va provoquer une diminution de la densité de la boue par rapport à celle du liquide interstitiel, et les boues ne décanteront plus ou mal. En France, environ 25 % des stations à boues activées sont touchés par des problèmes de bulking.

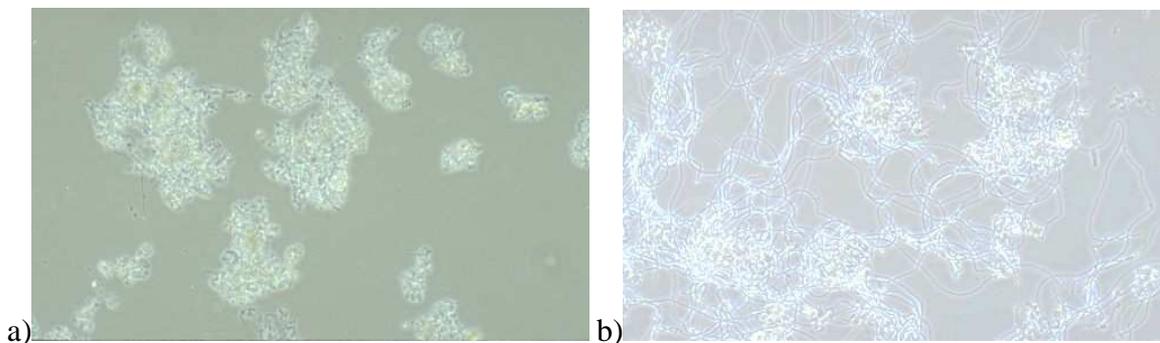


Figure 4 : a) floc à l'état "normal" b) floc lors d'un phénomène de bulking

Ce phénomène est souvent associé à une détérioration de la qualité du rejet de part la présence de MES, et de l'azote et du phosphore associés. Les boues ne décanteront pas ou mal, et vont être rejetées dans le milieu naturel avec l'effluent. Dans les cas extrêmes, les boues vont même aller jusqu'à sortir des bassins (cf. Figure 5).

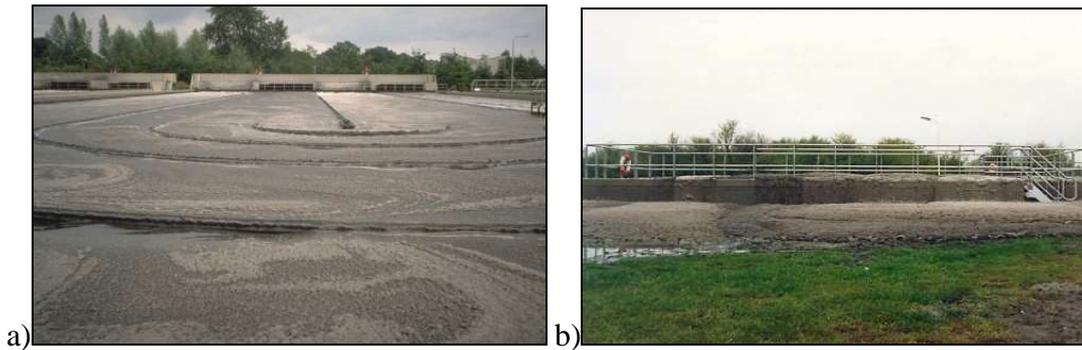


Figure 5 : a) Phénomène de bulking dans un bassin d'aération. b) Cas extrême de sortie de boue hors des bassins

En France, environ 50% des stations d'épuration par boues activées sont sujettes à des dysfonctionnements provoqués par des épisodes de foisonnement filamenteux, qu'il s'agisse de foaming ou de bulking, pouvant aboutir à un rejet de boues dans le milieu naturel. Dans un certain nombre de cas, ces événements vont conduire à une mise hors service plus ou moins longue de la station.

1.3.3 Caractérisation du foisonnement filamenteux

1.3.3.1 Indice de boue

L'indice de boue (IB) ou indice de Mohlman (I_M) est un test permettant d'apprécier l'aptitude de la boue à la décantation. Il représente le volume occupé par un gramme de boue après 30 minutes de décantation dans une éprouvette d'un litre (cf. Figure 6). L'IB est exprimé en mL.g^{-1} de MES et est défini par la formule suivante :

$$I_M = \frac{V}{M}$$

V : volume de boue décanté en trente minutes (en mL.L^{-1}) ;

M : concentration des matières en suspension dans l'éprouvette (en g.L^{-1}).



Figure 6 : Mesure de l'indice de boue en éprouvette

Une boue décantant correctement a un IB de l'ordre de 100 mL.g^{-1} . Le foisonnement est caractérisé par un indice de boue supérieur ou égal à 150 mL.g^{-1} . Au-delà de 150 mL.g^{-1} des difficultés de décantation apparaissent.

Ce paramètre a déjà été décrit précédemment. Il permet d'apprécier le risque de non-retenue de la biomasse dans le clarificateur et donc sa fuite dans le milieu récepteur. Une altération de la décantation est souvent un indicateur de la présence excessive de bactéries filamenteuses.

1.3.3.2 Mesure de la longueur totale des filaments

Il a été prouvé qu'il existait une corrélation entre la longueur totale des filaments dans un échantillon de boue et la valeur d'indice de boue (Palm *et al.*, 1980). En situation de foisonnement la longueur totale de filaments est supérieure à $10^7 \mu\text{m/mL}$.

1.3.3.3 Estimation de l'abondance des filaments

Cette technique permet d'avoir une idée globale de l'abondance des filaments dans un échantillon (Jenkins *et al.*, 2003). Des indices sont attribués aux boues en fonction de leur densité en filaments (cf. Tableau 3).

Indice	Densité des filaments	Description des échantillons
0	Nulle	Pas de filament
1	Très faible	Filaments seulement dans quelques floes
2	Faible	Filaments communs mais pas dans tous les floes
3	Faible à moyenne	Filaments dans tous les floes (1 à 5 par floc)
4	Moyenne	Filaments dans tous les floes (5 à 10 par floc)
5	Abondance	Filaments dans tous les floes (plus de 20 par floc)
6	Excessive	Plus de filaments que de floes, filaments présents dans le liquide interstitiel

Tableau 3 : Échelle de classification des boues en fonction de leur densité en filaments^c (Pujol, 1987; Jenkins *et al.*, 2003)

1.3.4 Les facteurs inducteurs du foisonnement filamenteux

Les facteurs inducteurs de la filamentation ont fait l'objet de diverses études au cours des 30 dernières années (Chudoba *et al.*, 1974; Strom & Jenkins, 1984; Duchène, 1994; Jenkins *et al.*, 2003). Ces facteurs sont multiples et spécifiques pour chacune des espèces de bactéries filamenteuses.

✓ Les carences en substrat :

On peut également parler de déséquilibre nutritionnel plutôt que de carences (Pujol, 1987). Chudoba *et al.*, (1973) ont montré qu'en présence de faibles concentrations en substrat, en particulier en carbone, un avantage certain était conféré aux bactéries filamenteuses par rapport aux bactéries non filamenteuses (cf. Figure 7). La situation est inversée en présence de fortes concentrations, car dans ce cas l'accès au substrat est facilité.

^c Cette échelle de 0 à 6 représente une variation d'un facteur de 100 à 1000 de la longueur totale des filaments.

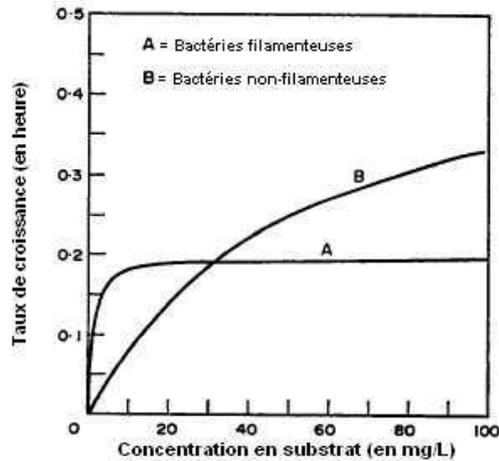


Figure 7 : Comparaison des taux de croissance des bactéries filamenteuses et non-filamenteuses en fonction de la concentration en substrat, dans ce cas le carbone (Chudoba *et al.*, 1973)

✓ Les carences en oxygène

L'oxygène joue un rôle important dans le procédé d'épuration biologique car la majorité des microorganismes des boues activées est aérobie. Certains peuvent survivre à de longues périodes sans oxygène, de quelques jours à quelques semaines en fonction des microorganismes (Maurines-Carboneill *et al.*, 1998). Une carence en oxygène trop prolongée va avoir des conséquences néfastes sur les boues activées. Ceci se traduira notamment par le développement des bactéries filamenteuses. La plupart ne se développent pas en absence totale d'oxygène. Cependant un état de carence, au même titre qu'une carence en nutriments, leur est moins défavorable qu'aux bactéries du floc. Leur morphologie leur confère une meilleure accessibilité aux solutés du milieu interstitiel.

✓ Les fortes charges massiques :

Une charge massique trop importante peut entraîner la prolifération de certaines espèces de bactéries filamenteuses comme *Sphaerotilus natans* (FNDAE N°8, 1990).

✓ Les faibles charges massiques :

De la même façon, de faibles charges massiques peuvent chez certaines espèces entraîner une croissance filamenteuse (*Microthrix parvicella*, Type 0092, Type 0041).

✓ La présence de composés soufrés réducteurs (S^{2-}) :

Les effluents septiques ou fermentescibles contiennent souvent des concentrations importantes en soufre réduit qui seront à l'origine de foisonnement de bactéries filamenteuses particulières (*Thiothrix sp.*, *Beggiatoa*).

✓ Septicité :

Un effluent septique se caractérise par la présence de sulfures (≈ 2 mg/L), mais aussi par la présence d'acides gras volatils (AGV) et par un potentiel rédox inférieur à -100 mV. Ce type d'effluent peut également conduire à la prolifération de certaines bactéries filamenteuses (*Microthrix parvicella*, Type 021N).

✓ La biodégradabilité du substrat :

La vitesse à laquelle un substrat donné va pouvoir être dégradé est un facteur influençant la croissance des bactéries filamenteuses. Dans certains cas on verra apparaître un épisode de foisonnement en présence d'un substrat rapidement dégradé (*Thiothrix*, Type 021N, Type 1851, *Haliscomenobacter hydroxsis*, *Sphaerotilus natans*, *Nostocoida limicola*). Dans le cas d'un substrat lentement dégradé, on observera un foisonnement d'autres souches filamenteuses (*Microthrix parvicella*, Type 0092, Type 0041).

✓ Les à-coups de charge :

Un à-coup de charge va provoquer une augmentation soudaine de la DBO5 et une brusque chute de la concentration en oxygène dissous. Ce type de stress se traduit souvent par une prolifération des microorganismes filamenteux (Pernelle *et al.*, 2001).

Au regard de ces différents éléments, on peut voir à quel point l'orientation de la dynamique des populations bactériennes est complexe. Elle passe inévitablement par une bonne connaissance et une maîtrise des facteurs favorisant la croissance des bactéries filamenteuses.

1.3.5 Les moyens curatifs et préventifs des épisodes de foisonnement filamenteux et de moussage

1.3.5.1 Moyens curatifs

○ Les agents oxydants

Lorsque le phénomène de foisonnement filamenteux est installé, les moyens d'action restent relativement limités. Les traitements sont quasiment exclusivement basés sur l'utilisation d'agents oxydants, et notamment le **chlore** et ses dérivés. L'ajout de doses contrôlées de chlore permet de limiter la croissance des germes filamenteux. Mais le chlore est également toxique pour l'ensemble des microorganismes présents dans les boues. Un traitement de ce type peut conduire à une grave altération de l'écosystème boues activées. De plus, la chloration aboutit au rejet dans l'environnement de diverses substances que l'on désigne sous l'appellation générale de CRT (Chlore Résiduel Total). Le CRT comprend le chlore libre sous ces différentes formes (HOCl , OCl^- , Cl_2), les chloramines organiques et inorganiques ($\text{NH}_x\text{Cl}_{3-x}$), les chloroalcanes, les chloroalcènes, les chloroaryles et d'autres substances halogénées. Les eaux chlorées peuvent entraîner une létalité aiguë chez les poissons et causer des modifications de la structure des communautés chez les invertébrés benthiques.

L'eau oxygénée est également employée pour traiter les épisodes de foisonnement filamenteux. Les conditions d'utilisation sont analogues à celle du chlore mais les doses employées sont plus fortes et le temps de contact doit également être plus long. Ce traitement est également plus onéreux que la chloration.

○ Les agents flocculants

Les agents flocculants vont faciliter l'agglomération des flocs sans être toxiques pour les microorganismes. Leur efficacité n'est pas toujours garantie. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le **FeSO₄**, notamment sur des foisonnements dus à *Sphaerotilus natans*, aux types 1701, 0041 et 961 et, dans une moindre mesure, avec la chaux sur le type 021N.

Bien que la plupart du temps efficaces, ces traitements sont à utiliser avec la plus grande précaution en raison de la profonde altération qu'ils peuvent causer sur l'ensemble de l'écosystème des boues activées. Mal maîtrisée, la chloration peut en particulier conduire à la perte de l'activité nitrifiante et à l'apparition de chloramines dans les rejets. L'usage des

floculants accroît les masses de boue produites. Il est donc préférable d'agir sur les causes de l'apparition du foisonnement plutôt que de le traiter après son apparition.

1.3.5.2 Moyens préventifs

Afin d'éviter l'apparition de bulking sur une station d'épuration à boues activées, il est indispensable d'agir sur les conditions d'exploitation, mais aussi sur la conception de la station.

En ce qui concerne la conception, la création d'une **zone de contact** en amont du bassin d'aération est une méthode répandue pour éviter le phénomène de foisonnement filamenteux. Cette technique consiste à réaliser un mélange de boue et d'effluent à traiter dans un bassin de faible volume. On accroît donc artificiellement la teneur en substrat disponible pour les microorganismes, et la croissance des bactéries non filamenteuses est favorisée puisque dans ce cas on a une C_m élevée.

En ce qui concerne les conditions d'exploitation, **l'optimisation de l'aération** est un facteur primordial dans la prévention du bulking. Il convient d'assurer une oxygénation suffisante pour éviter le développement de microorganismes filamenteux favorisé par les carences en oxygène (augmentation des durées d'aération). Dans le cas de foisonnement de microorganismes autotrophes du soufre, il est souhaitable d'oxyder les composés réducteurs en amont du bassin d'aération. Ceci est réalisable grâce à l'injection de solutions commerciales dans les réseaux. Ce procédé biologique entraîne une modification de l'activité bactérienne bloquant la synthèse de H_2S .

Dans le cas de carences très marquées, déjà apparentes aux vues des caractéristiques analytiques de l'effluent à traiter, une **complémentation en nutriments** (N ou P) peut également avoir lieu. C'est le cas des effluents d'origine agro-alimentaire (sucrieries, malteries, papeteries) très riches en carbone et pauvres en azote. Cet ajout est réalisé en tête de station et peut être combiné aux autres procédés de maîtrise du foisonnement.

2. Les bactéries filamenteuses des boues activées

Comme il a été décrit précédemment, les bactéries filamenteuses sont à l'origine de la plupart des dysfonctionnements d'ordre biologique des stations d'épuration à boues activées. Mais ces

microorganismes, bien que constituant un risque potentiel pour la station, sont également des éléments essentiels de l'écosystème boues activées.

2.1 Rôle des bactéries filamenteuses dans les boues activées

En dépit du risque qu'elles représentent, les bactéries filamenteuses sont une composante essentielle des boues activées. C'est en effet un élément indispensable à la structuration du floc. Une hypothèse (Sezgin *et al.*, 1978), qui a depuis largement été reprise (Jenkins *et al.*, 1984; Jenkins *et al.*, 2003) est que les micro-organismes filamenteux formeraient ce que l'on peut considérer comme le "squelette" ou la charpente du floc. Les bactéries floculantes vont pour leur part se regrouper en amas autour d'un support minéral ou organique et des filaments. La cohésion de l'ensemble va être assurée par la production d'exopolysaccharides. Cependant, certains auteurs (Wanner & Grau, 1989) ont émis l'hypothèse que l'élément primordial de la structuration du floc est la matrice d'exopolysaccharides produite par les bactéries floculantes, plutôt que les filaments eux-mêmes.

2.2 Principales bactéries filamenteuses

Une quarantaine de micro-organismes filamenteux différents ont été recensés dans l'écosystème boues activées des stations d'épuration des eaux résiduaires urbaines (Eikelboom, 1975) et industrielles (Eikelboom, 2006). Leur identification et leur classification sont basées en très grande partie sur les travaux d'Eikelboom (1975) et sur les modifications apportées par Jenkins *et al.* (1984). L'identification selon la méthode d'Eikelboom sera détaillée ultérieurement.

Voici une brève présentation des principaux micro-organismes filamenteux impliqués dans les dysfonctionnements biologiques des boues activées :

2.2.1 Microthrix parvicella :

C'est un filament très fréquent et responsable des problèmes de foisonnement dans les boues activées (Rossetti *et al.*, 2004) à faible charge et aération prolongée. La prolifération de ce microorganisme est favorisée par les basses températures. C'est une bactérie Gram-positif et Neisser-négatif présentant souvent des inclusions Neisser-positives. Les cellules ont une

taille de 0,6 à 0,8 μm de large et 0,8 à 1 μm de long. Le filament est long (100 à 500 μm), très souple et courbé ou en hélice à l'intérieur du floc. Il est dépourvu de gaine.

Une nouvelle espèce de *Microthrix*, baptisée *Microthrix calida* a récemment été identifiée à partir de boues activées de stations d'épuration (Levantesi et al., 2006).

2.2.2 Type 0581 :

Ce type bactérien est morphologiquement très proche de *Microthrix parvicella*, mais avec une coloration Gram-négative. Le filament est également moins long (100 à 200 μm) et plus fin (0,4 à 0,8 μm). On ne retrouve pas non plus de gaine autour du filament.

2.2.3 Thiothrix :

Ce genre bactérien fait partie des gammaprotéobactéries. Il se divise en 2 sous-groupes : Thiothrix I et II.

- *Thiothrix I* se présente sous la forme d'un filament droit ou légèrement courbe de 100 à 500 μm de long et de 1,6 à 2,5 μm de diamètre. Les cellules qui le composent sont d'aspect très rectangulaire à l'observation et mesurent de 2 à 4 μm de long pour 1,6 à 2,5 μm de large. Le filament est entouré d'une gaine assez épaisse. On observe très souvent la formation de rosettes, (de nombreux filaments irradiant à partir d'un même point), et de gonidies à l'extrémité du filament. La bactérie *Thiothrix I* est Gram-négative, Neisser-négative et contient des granules de soufre.
- *Thiothrix II* se présente sous la forme d'un filament droit ou légèrement courbe de 50 à 200 μm de long, composé de cellules rectangulaires de 1,5 à 3 μm de long et de 0,8 à 1,4 μm de large. On observe également la présence de gonidies et de rosettes. *Thiothrix II* est Gram-négative et Neisser-négative, et contient des granules de soufre. Contrairement à *Thiothrix I*, le trichome est ici entouré d'une très fine gaine difficile à observer.

2.2.4 Eikelboom type 021N ou *Thiothrix eikelboomii* :

Ce genre bactérien est très fréquemment rencontré dans les boues activées. Il se présente sous la forme d'un long filament rigide pouvant atteindre jusqu'à 1 000 μm de long, composé de cellules d'un diamètre de 0,7 à 4 μm et d'une longueur de 0,5 à 5,5 μm . Les cellules qui le composent sont de forme irrégulière, le plus souvent carrée ou discoïde. Cette bactérie fait partie des gammaprotéobactéries. Elle est Gram-négative et Neisser-négative, mais contient de fines granulations de PHB et des granules de soufre. Comme pour *Thiothrix*, on peut observer la formation de rosettes et de gonidies. Aucune gaine n'est observée autour du trichome. L'espèce Eikelboom type 021N est subdivisée en 3 groupes : I, II et III. Ils se différencient sur la base de leurs séquences d'ARNr 16S (Kanagawa *et al.*, 2000).

Comme nous avons pu le voir précédemment, les souches Eikelboom type 021N et *Thiothrix* présentent des différences notables au niveau morphologique, notamment la présence d'une gaine pour *Thiothrix* et son absence chez Eikelboom type 021N. Mais elles présentent aussi de nombreuses caractéristiques communes (formation de rosette et gonidies) d'un point de vue phylogénétique, *Thiothrix* est le voisin le plus proche du type 021N. De plus, ces deux espèces présentent dans leur séquence de l'ARNr 16S une délétion caractéristique d'une structure en boucle située dans la région 455-477 (numérotation *E.coli*). Il a donc été proposé d'intégrer Eikelboom type 021N comme une espèce particulière du genre *Thiothrix* (Howarth *et al.*, 1999). Tout comme *Thiothrix*, certaines souches d'Eikelboom type 021N possèdent dans leur cytoplasme des granules de soufre. Il a donc été proposé de rebaptiser certaines de ces souches, notamment Eikelboom type 021N AP3^T, sous le nom de *Thiothrix eikelboomii* (Howarth *et al.*, 1999).

2.2.5 *Nostocoïda limicola* :

Fréquemment rencontré dans les boues activées, le genre *Nostocoïda limicola* se divise en 3 groupes (I, II et III) qui sont principalement différenciés par leur taille (longueur du filament et taille des cellules). La taille du filament varie entre 50 et 300 μm . Il n'y a pas de gaine entourant le filament. Les cellules qui composent le trichome sont de forme irrégulière, le plus souvent ovale d'une taille de 0,8 à 1,5 μm de large sur 1 à 2 μm de long.

Comme pour le type 021N, il s'agit d'une alphaprotéobactérie fréquemment responsable d'épisode de bulking (Levantesi *et al.*, 2004).

Les espèces de *Nostocoïda limicola* sont toutes Gram-positive, Neisser-positive, et ne contiennent pas de granules de soufre. Il est à noter que la coloration de Gram peut être négative dans le cas d'effluents industriels, en particulier ceux issus de papeteries.

Les groupes I, II et III ont été regroupés sous la dénomination *Nostocoïda limicola* sur la base de critères morphologiques. Une étude a permis de déterminer qu'ils étaient en fait totalement différents d'un point de vue phylogénétique (Seviour *et al.*, 2001):

- Groupe I : Firmicutes
- Groupe II : Actinobactéries
- Groupe III : Planctomycetes

2.2.6 Type 0041 et Type 0675 :

Le type 0041 est un filament raide pouvant mesurer de jusqu'à 500 µm et composé de cellules rectangulaires de 1,2 à 1,6 µm de large et 1,5 à 4 µm de long. Le trichome est recouvert d'une gaine. Il est important de noter que ses filaments sont la plupart du temps entourés de particules en raison d'un phénomène d'adhérence.

La coloration de Gram de cette bactérie est assez variable (plutôt faiblement positive), alors que celle de Neisser est négative.

Le type 0675 possède les mêmes caractéristiques que le type 0041, mais ses filaments sont plus courts, de 50 à 150 µm. C'est pourquoi les deux filaments ont été regroupés sous la dénomination commune de type 0041/0675 (Eikelboom, 2000).

2.2.7 *Haliscomenobacter hydrossis* :

Cette espèce bactérienne se présente sous la forme d'un filament très rigide et très fin, d'une longueur comprise entre 10 et 100 µm et d'un diamètre de 0,5 µm. Elle fait partie des Bacteroïdètes. Les colorations de Gram et Neisser sont toutes les deux négatives pour cette bactérie. Ce filament peut se retrouver à l'intérieur du floc, mais il peut également se rencontrer libre en suspension. Une gaine entoure le filament.

Des microorganismes dits bacteroides et proches de cette espèce bactérienne ont récemment été identifiés dans des boues activées (Kragelund *et al.*, 2008).

2.2.8 Type 0092 :

Ce filament est de forme assez variable (rigide ou courbe), plutôt court (de 10 à 80 µm de long) et souvent situé à l'intérieur du floc. Les cellules qui le constituent sont de forme rectangulaire (0,6 X 1,5 µm), mais sont très difficilement observables. Il n'y a pas de gaine autour du trichome. Type 0092 est fréquemment responsable des problèmes de bulking en boues activées.

2.2.9 Type 0961 :

Il est d'aspect rigide et long (de 200 à 500 µm). Les cellules qui le composent sont rectangulaires et allongées, de 1 à 1,4 µm de large sur 2 à 4 µm de long. Une caractéristique importante est que les cellules apparaissent comme translucides. Il n'y a pas de gaine entourant le filament, mais une matrice d'exopolysaccharides. Les colorations de Gram et de Neisser sont toutes les deux négatives.

2.2.10 Sphaerotilus natans

Cette bactérie est fréquemment rencontrée dans les phénomènes de bulking, mais essentiellement en Amérique du Nord, et dans les stations traitant des effluents provenant d'industries agroalimentaires. Par contre on ne la rencontre que très rarement dans les stations à boues activées en France. Cette espèce sera traitée de façon beaucoup plus complète ultérieurement. C'est un filament long (jusqu'à 1 000 µm) et rigide. Les cellules sont rectangulaires aux extrémités arrondies et d'une taille de 1,5 à 2 µm de diamètre et 2 à 5 µm de longueur. Le trichome est entouré d'une gaine de polysaccharides. La principale caractéristique morphologique de ce filament est de posséder de fausses ramifications (filaments collés) et non de vrais embranchements.

Les colorations de Gram et Neisser sont négatives. Les cellules contiennent parfois des granules de PHB quand elles se développent dans un milieu riche en glucose par exemple (cf. Figure 9 A).

2.2.11 Autres

D'autres genres bactériens ont été identifiés dans les boues activées mais sont rencontrés de façon moins fréquente dans les événements de bulking : type 0803, type 0914, type 1851, type 1863, type 0411, type 1701, *Beggiatoa* sp.

La distribution des microorganismes filamenteux dans les boues activées varie considérablement en fonction de la situation géographique et de la saison. Des enquêtes menées dans divers pays ont permis de montrer que les espèces bactériennes impliquées dans les épisodes de foisonnement filamenteux n'étaient pas les mêmes partout. Ces différences peuvent s'expliquer par les variations climatiques qui existent entre l'Europe, les États-Unis et l'Afrique du Sud par exemple, ainsi que par les variations de configuration des stations d'épuration. En Europe, les espèces les plus fréquemment impliquées dans les bulking sont *Microthrix parvicella*, type 0092 et type 0041 (Madoni *et al.*, 2000; Graveleau *et al.*, 2005).

Mais au total c'est une quinzaine de microorganismes filamenteux qui peuvent être impliqués dans ces foisonnements dans les stations de traitement des eaux résiduaires urbaines européennes : *M. parvicella*, type 0092, type 0041, les Nocardioformes, *N. limicola*, type 0803, Eikelboom type 021N, *Thiothrix*, type 1701, type 1851, *S. natans*, *H. hydrossis* et *Beggiatoa* (Eikelboom *et al.*, 1998).

Dans le cadre de cette thèse, *Sphaerotilus natans* a été choisi comme modèle. C'est un des premiers microorganismes filamenteux à avoir été identifié comme étant impliqué dans le foisonnement filamenteux en boues activées. C'est pourquoi il a longtemps été considéré comme un des responsables majeurs de ce type de dysfonctionnement. Ce microorganisme présente aussi l'avantage considérable d'être facilement cultivable en laboratoire à la différence de la plupart des autres espèces de bactéries filamenteuses.

3. Notre bactérie modèle : *Sphaerotilus natans*

3.1 Morphologie

S. natans a tout d'abord été décrit sous sa forme de filament. Mais ce microorganisme possède la caractéristique de pouvoir croître sous deux morphologies différentes : filaments et cellules

dispersées (cf. Figure 8). Les facteurs environnementaux ou les conditions de culture peuvent induire l'orientation vers une forme de croissance ou l'autre.

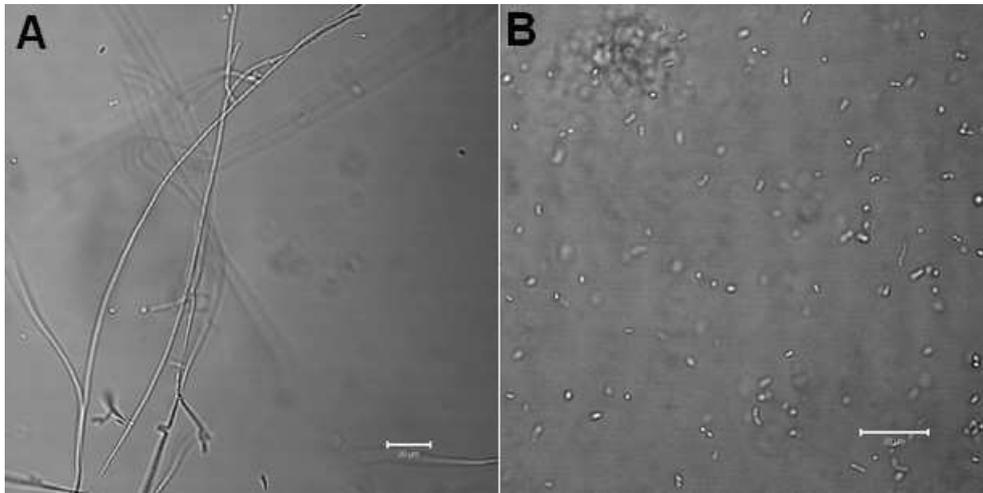


Figure 8 : *S. natans* sous ces deux formes de croissance : A) filamenteuse et B) dispersée (Suzuki *et al.*, 2002)

L'aspect de filament a déjà été décrit précédemment. En ce qui concerne l'état unicellulaire, les cellules ont une forme de type bacille, c'est-à-dire cylindrique à bouts hémisphériques. Leur taille varie entre 1,2 à 1,8 µm de diamètre et 3 à 8 µm de long. Ces cellules individuelles peuvent être mobiles et posséder une touffe de flagelles subapicale (Hoeniger *et al.*, 1973) (cf. Figure 9).

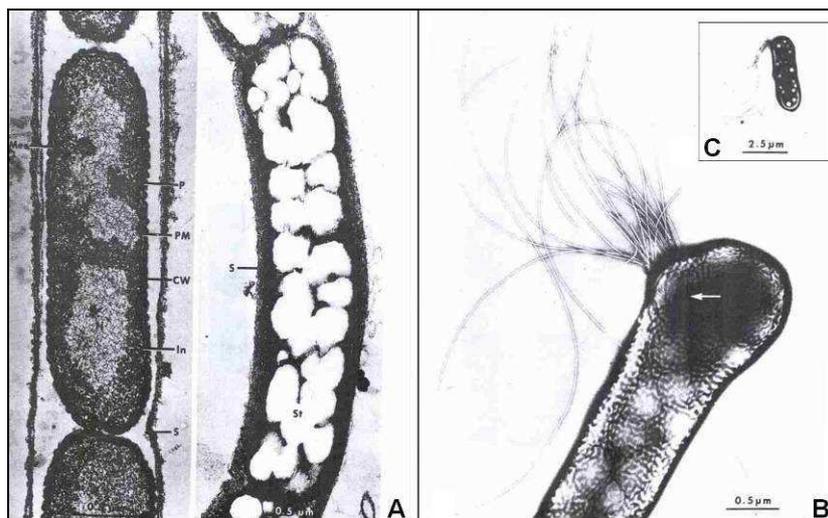


Figure 9 : A) section longitudinale d'un filament gainé de *Sphaerotilus natans* cultivé en bouillon sans glucose (à gauche) et avec glucose (à droite). B) Touffe de flagelles dans la région subpolaire d'une cellule dispersée et mobile. C) Cellule dispersée flagellée

3.2 Phylogénie

Sphaerotilus natans a été décrite pour la première fois en 1833 par Kützing et était d'abord nommée *S. natans* Kützing (Bahr, 1953). Ce microorganisme a été redécouvert en 1875 par Cohn qui en raison de son aspect ramifié l'a baptisé *Cladothrix dichotoma*. Cette dénomination n'est aujourd'hui plus utilisée. Stokes a lui aussi largement étudié cette espèce par la suite (Stokes, 1954). Cinq souches de *S. natans* sont actuellement référencées. Leur désignation courante est celle qui leur a été attribuée par la collection de l'ATCC : ATCC 13338T (1^{ère} souche isolée), ATCC 13929, ATCC 15291, ATCC 29329 et ATCC 29330.

S. natans appartient à la classe des Bétaprotéobactéries et à la famille des Burkholderiales. Dans le Bergey's of systematic bacteriology (Vol.3, 1994-2004), elle est classée, sur des bases morphologiques, dans le groupe des bactéries gainées (sheathed bacteria), comme *Leptothrix*.

Ces deux microorganismes sont très proches et ils sont d'ailleurs souvent regroupés sous la désignation de groupe *Sphaerotilus-Leptothrix*. Ce rapprochement se base sur leurs caractéristiques morphologiques communes (la présence d'une gaine autour du filament, la présence de granules de PHB dans leur cytoplasme) et sur le fait que la teneur en GC de leur génome est très proche (Crombach *et al.*, 1974) : 69,7 % pour *S. natans*, 69,6 % pour *L. cholodnii* et 71,2 % pour *L. discophora*.

Bien qu'elles soient effectivement très proches, certaines caractéristiques permettent cependant de différencier *Sphaerotilus* de *Leptothrix*. En premier lieu la taille des cellules. Celles de *Sphaerotilus* sont plus larges. Les fausses ramifications, très caractéristiques de *S. natans* ne sont jamais rencontrées chez *Leptothrix*. Des études phylogénétiques ont cependant permis de mettre en évidence une véritable différence entre ces espèces (Siering & Ghiorse, 1996). On pourrait donc séparer ce groupe en 3 lignées : une lignée *S. natans* et deux lignées *Leptothrix* (cf. Figure 10) qui restent cependant proches d'un point de vue phylogénétique.

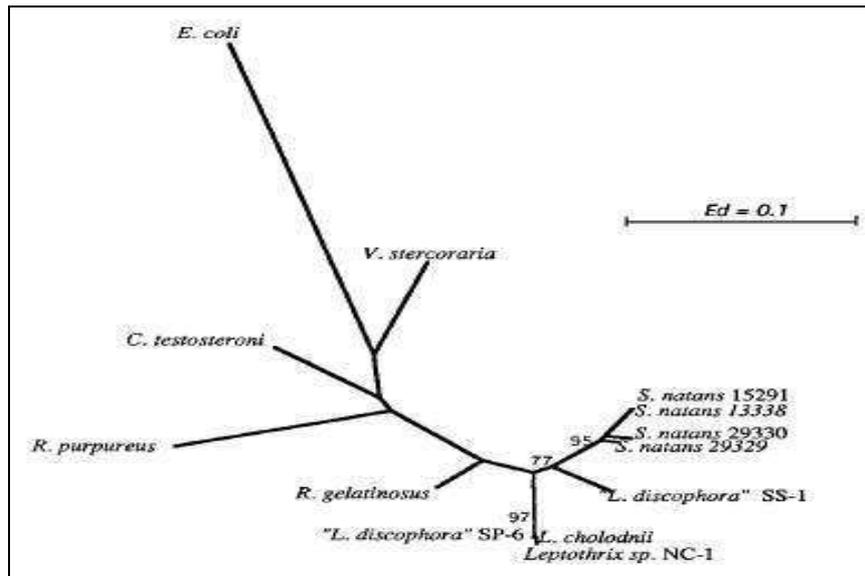


Figure 10 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du gène de l'ARNr 16S (Siering & Ghiorse, 1996)

Le génome de *S. natans* n'est à l'heure actuelle pas encore séquencé. Seules quelques séquences nucléotidiques de l'espèce sont disponibles dans les banques de données, et elles correspondent principalement à l'ARNr 16S.

3.3 Physiologie générale

3.3.1 Sources de carbone et d'énergie

S. natans est capable d'utiliser une large gamme de composés organiques comme source de carbone et d'énergie : glucose, galactose, sucrose, maltose, mannitol, sorbitol, succinate, sorbitol, fumarate, butanol, glycérol, lactate, pyruvate, acétate et éthanol (Scheuring & Höhnl, 1956).

L'acétate et le butyrate peuvent également faire partie des sources de carbones. Cependant, au-delà d'une certaine concentration, ils s'avèrent toxiques. En ce qui concerne des composés tels que le lactose, le xylose, l'arabinose, le benzoate, le propanol ou le méthanol, on n'observe qu'une très faible croissance, voire même aucune croissance (Stokes, 1954).

3.3.2 Sources d'azote

S. natans peut utiliser lors de sa croissance une grande variété de sources d'azote, comme par exemple des sels d'azote inorganique, des mélanges d'acides aminés ou bien encore des peptones ou des extraits de viandes (Stokes, 1954).

3.3.3 Température

En considérant un milieu favorable à la croissance de *S. natans* et contenant 0,1% de glucose et de peptone, ainsi que des sels minéraux, toutes les souches se développent, dans une gamme de température comprise entre 15 et 40°C. La température optimale de croissance est d'environ 30°C, et les croissances à 15 et 40°C sont lentes (Stokes, 1954).

3.3.4 pH

On obtient une croissance rapide et abondante si la culture est réalisée dans un milieu ayant un pH situé entre 6,4 et 8,1. En dessous de 5,5 aucune croissance n'est possible, mais elle peut être initiée au pH de 9 ou 10 (Stokes, 1954).

3.3.5 Besoins en oxygène

S. natans est un microorganisme aérobic, il ne peut se développer en absence d'oxygène (Mechsner, 1983). Ceci est notamment mis en évidence par sa tendance à se développer à la surface des tubes ou flasques lorsqu'il est cultivé en milieu liquide.

Il peut cependant croître en présence de très faibles quantités d'oxygène, mais il ne supporte pas les longues périodes d'anaérobiose.

3.4 *Les différentes contributions de S. natans*

3.4.1 Contributions à l'épuration et à la dépollution des eaux

La capacité à oxyder le fer est une des propriétés les plus caractéristiques de *S. natans*. Cette bactérie est capable de fixer les ions Fe (III) à l'intérieur ou à la surface de la gaine (Van Veen *et al.*, 1978). À la différence de *Leptothrix*, et contrairement à ce qui a été décrit dans un premier temps (Johnson & Stokes, 1966), ce microorganisme n'est pas capable d'oxyder le Manganèse (Mn).

S. natans est également capable d'adsorber de nombreux ions métalliques. Ce phénomène d'adsorption des polluants par la biomasse est appelé biosorption. Ce processus est utilisé dans le traitement des eaux résiduaires urbaines et surtout industrielles pour l'élimination des métaux lourds et d'autres polluants. Il est également utilisé pour la purification des métaux précieux comme l'or ou l'argent à partir de particules du sol. En ce qui concerne *S. natans*, ce microorganisme est capable d'adsorber les ions Cr (III) (Lodi *et al.*, 1998; Solisio *et al.*, 2000), Pb (Qin *et al.*, 2005a), Cd (Lodi *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 2005b), ainsi que les ions Cu, Zn, Ag, (Lodi *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 2001; Pagnanelli *et al.*, 2003; She *et al.*, 2005).

En plus des capacités épuratoires classiques des bactéries des boues activées (dégradation de la pollution organique), *S. natans* montre une aptitude tout à fait originale et intéressante pour l'élimination de polluants d'ordinaire difficiles à traiter comme le sont les métaux lourds. De nombreuses études ont été et sont encore menées sur la façon dont pourrait être utilisée cette capacité dans le traitement des eaux usées, et en particulier pour les effluents de types industriels. Cependant l'utilisation d'un tel microorganisme pour la biosorption des métaux lourds en station d'épuration semble compliquée en raison des problèmes de foisonnement filamenteux qui pourraient en résulter.

3.4.2 Contributions éventuelles à la médecine

Au cours des années 80, des études ont mis en évidence une aptitude plus surprenante de *S. natans*. En effet, il a été démontré (Mifuchi *et al.*, 1985) que ce microorganisme aurait une activité anti-tumorale. Par la suite, il a également été mis en évidence que *S. natans* et surtout les exopolysaccharides que sécrète cette bactérie, pourraient avoir une activité immunostimulatrice. Cette activité agirait notamment en stimulant les macrophages (Masuzawa *et al.*, 1987).

3.5 Dimorphisme de *S. natans* :

3.5.1 En cultures pures

Comme cité précédemment, *S. natans* fait partie des bactéries filamenteuses qui peuvent aussi exister à l'état unicellulaire. L'observation de bactéries isolées avait été réalisée au début du XX^{ème} siècle, mais les auteurs avaient alors désigné les microorganismes adoptant cette morphologie *Cladothrix dichotoma* (Naumann, 1933). Plus tard, une conversion de *Cladothrix* en *S. natans* lors d'une culture en milieu pauvre a été rapportée (Bahr, 1953). Il a

depuis été démontré qu'il s'agissait en fait de la même souche se développant sous deux morphologies distinctes. Ce sont les facteurs environnementaux qui vont guider la croissance vers une forme ou l'autre.

Des études sur des cultures pures des différentes souches de collection ont mis en évidence que la croissance de *S. natans* sous sa forme monocellulaire a lieu lorsque les conditions sont favorables pour le microorganisme (Gaval, 2001b). Ainsi, en utilisant un milieu de culture contenant une source de carbone facilement assimilable et des peptones ou casitone, avec un apport important en oxygène (culture liquide avec agitation ou sur boîte de Petri) et à une température comprise entre 25 et 30°C, ce microorganisme adopte la morphologie unicellulaire. Il faut également noter que ce type de croissance est largement favorisé par une culture sur gélose.

Si les conditions de culture changent, et deviennent plus défavorables à la bactérie, la croissance va alors avoir lieu sous forme filamenteuse. C'est notamment le cas lorsque la culture a lieu en milieu liquide. Un milieu de culture faiblement concentré (en C et N) aura le même effet sur la morphologie adoptée par le microorganisme. Lorsque les cultures en milieu liquide sont réalisées sans agitation, on observe là encore la formation de filaments. Cette absence d'agitation entraîne un déficit d'apport en oxygène. Les carences en oxygène sont également un facteur inducteur de la filamentation (Gaval, 2001b; Gaval & Pernelle, 2003). Ce qui confirme les observations déjà faites sur des boues activées décrivant l'apparition de foisonnements filamenteux liés à *S. natans* comme étant favorisée par des carences en oxygène (Eikelboom, 2000).

Ces résultats montrent que la morphologie filamenteuse est adoptée lors des situations de stress. Cette forme particulière de croissance serait une adaptation des espèces bactériennes au milieu et à une situation défavorable. Chez *Saccharomyces cerevisiae* (Morillon *et al.*, 2000), la filamentation, bien qu'extrêmement rare, va permettre au microorganisme de coloniser un milieu plutôt hostile et d'atteindre les nutriments et les autres éléments nécessaires à sa survie et à sa prolifération en dehors des structures agrégées. Le filament correspondrait à une stratégie de collaboration entre les individus. En effet, des échanges de métabolites ou de nutriments ont lieu entre les bactéries au sein du trichome. Ceci va permettre d'assurer la survie de l'espèce en attendant un retour à une situation plus favorable.

Des études ont permis de démontrer que les transitions morphologiques observées chez *S. natans* étaient réversibles (Gaval, 2001b). Il est possible d'obtenir une population de bactéries sous forme monocellulaire à partir d'un inoculum ne contenant que des filaments. Il suffit pour cela de modifier les conditions de culture en les rendant plus favorables pour le microorganisme. De la même façon, il est aisé de provoquer l'apparition de filaments à partir d'une culture ne contenant initialement que des effectifs monocellulaires. Il suffit pour cela de les transférer dans un milieu pauvre en nutriment et/ou en oxygène.

3.5.2 En boues activées

On a longtemps pensé que *S. natans* n'était présent dans les stations d'épuration qu'à l'état de filament. Mais des amas de cellules ou des cellules dispersées, ont été identifiées dans des boues activées grâce à l'hybridation de sondes FISH spécifiques (Gaval, 2001b). Avant l'utilisation des techniques de biologie moléculaire pour l'identification, il était très difficile d'identifier et même d'observer des bactéries telles que *S. natans* à l'état dispersé dans un milieu aussi complexe que les boues activées. En effet sous sa forme monocellulaire, cette bactérie ne possède pas de caractéristiques morphologiques permettant de pouvoir l'identifier de façon précise. De plus à l'état dispersé, les cellules sont le plus souvent situées à l'intérieur des flocs (cf. Figure 11) et ne sont donc pas visibles en microscopie classique à contraste de phase.

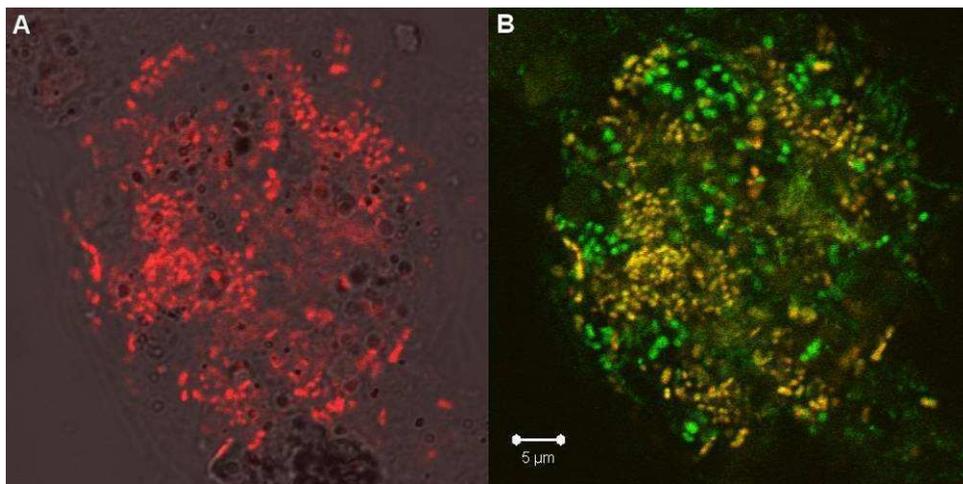


Figure 11 : Mise en évidence de la présence de *S. natans* sous forme monocellulaire au sein d'un floccule de boues activées. A) Hybridation des bactéries avec la sonde SNA marquée au Cy3. B) Hybridation des sondes SNA-Cy3 et EUB338-FITC.

Lors de l'application de stress sur des boues, tels que des carences en oxygène ou des à-coups de charge, on peut voir une augmentation des effectifs filamenteux (Gaval *et al.*, 2000a; Gaval & Pernelle, 2003). C'est notamment le cas pour *S. natans*. Peu de temps après l'application du stress, dans ce cas une carence en oxygène, les effectifs filamenteux augmentent fortement (cf. Figure 12).

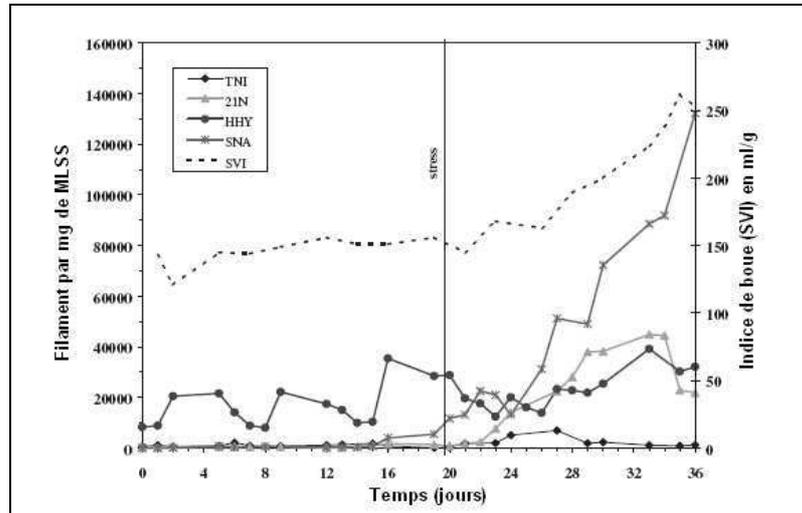


Figure 12 : Effet de l'application d'un stress sur la population filamenteuse d'une boue activées et l'indice de boue (SVI). Les différentes bactéries filamenteuses suivies sont *T. nivea* (TNI), Type 021N (21N), *H. hydrossis* (HHY) et *S. natans* (SNA) (Gaval *et al.*, 2002).

Lorsque la situation de stress cesse, les effectifs filamenteux diminuent fortement. Si l'on applique un nouveau stress, les effectifs filamenteux vont réapparaître de façon encore plus importante que lors du premier stress (cf. Figure 13).

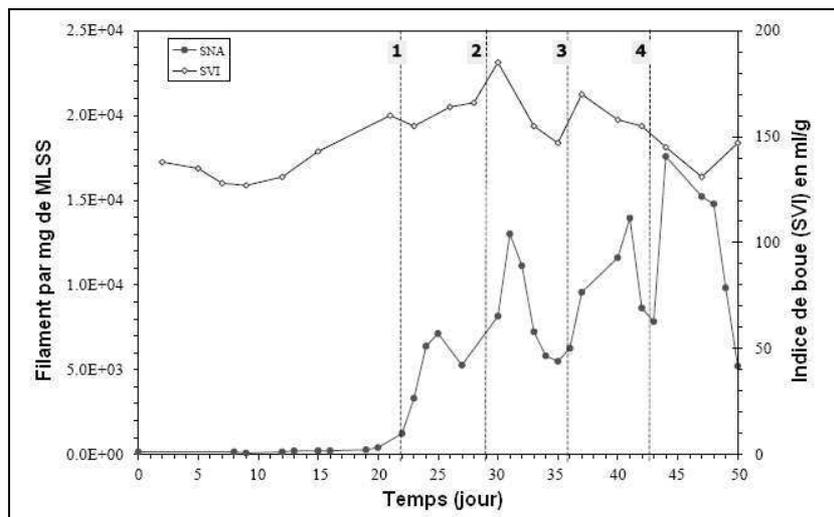


Figure 13 : Évolution des effectifs filamenteux de *S. natans* en boues activées par FISH (SNA), ainsi que de l'indice de boue (SVI) après application séquentielle de 4 stress.

À chaque nouveau stress, la réponse des filaments est amplifiée. Il est important de noter que cette augmentation importante du nombre de filaments ne se traduit pas immédiatement par une augmentation de l'indice de boue. Ceci montre que ce moyen de diagnostic du foisonnement présente un degré d'anticipation quasiment nul.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la brusque diminution des effectifs observée en FISH après l'arrêt du stress.

- ✓ Bien que cela soit peu probable en réponse à un retour à une situation plus favorable que la précédente, il pourrait s'agir d'un phénomène de mort cellulaire massive.
- ✓ La méthode de comptage utilisée dans ces études est basée sur l'utilisation de la technique FISH. Les cibles des sondes FISH étant les ARNr 16S, la réponse de ce signal est donc directement liée au taux d'ARNr intracellulaire. Il apparaît comme étant corrélé à l'état physiologique de la cellule (Poulsen *et al.*, 1993; Rossetti *et al.*, 2007). Il est donc possible que si l'activité physiologique des bactéries est ralentie, le nombre de filaments soit sous-estimé. Plus qu'une réelle diminution des effectifs, il pourrait donc s'agir d'un biais de quantification dû à la technique FISH.
- ✓ Les conditions redevenant à nouveau plus favorables au microorganisme, c'est la croissance sous forme monocellulaire qui devrait alors être privilégiée. On peut donc supposer avoir à faire à une dépolymérisation des filaments et une recolonisation du milieu par des individus sous forme dispersée. Cette "défilamentation" impliquerait donc qu'il y ait simultanément une dégradation ou déstructuration de la gaine polysaccharidique et une sortie des cellules du filament.

3.6 La gaine de *S. natans*

La présence d'une gaine autour du filament est une des principales caractéristiques de *S. natans*. Son étude est indispensable lorsque l'on s'intéresse au phénomène de filamentation.

3.6.1 Mise en évidence et observation de la gaine de *S. natans*.

La gaine de *S. natans* n'est pas toujours très visible lors d'observation en microscopie à contraste de phase. Elle est plus aisée à visualiser lorsque certaines cellules manquent à l'intérieur du filament. L'utilisation de la coloration au bleu de méthylène ou au cristal violet

permet la mise en évidence de la gaine. Les cellules sont ainsi colorées en bleu et la gaine apparaît elle de façon plus claire (cf. Figure 14).



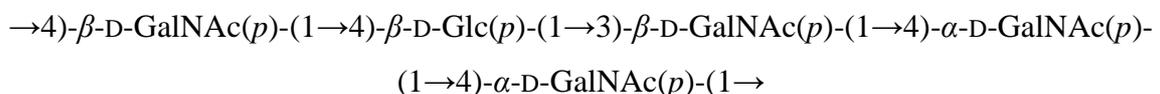
Figure 14 : Mise en évidence de la gaine par coloration au cristal violet (d'après FNDAE N°33)

3.6.2 Composition et structure de la gaine de *S. natans*

La gaine de *Sphaerotilus natans* est principalement composée de polysaccharides. Ils représentent en effet près de 70 % de la masse de la gaine. Les protéines sont présentes à hauteur de 27 % et les lipides à hauteur de 3 % (Takeda *et al.*, 1998).

3.6.2.1 Polysaccharides

Le polysaccharide de la gaine serait constitué d'une unité de répétition composée de 5 résidus osidiques, à savoir 4 résidus (N-acétyl)galactosamine et un glucose (Takeda *et al.*, 1998; Takeda *et al.*, 2003a). L'unité de répétition possède la structure suivante :



Cette composition est peu fréquente dans le monde microbien. En effet, c'est l'un des rares exemples actuellement connus de polysaccharide microbien basique. La plupart des polysaccharides extracellulaires produits par les microorganismes sont acides ou neutres. Seuls *Glucoacetobacter xylinum* et *Agrobacterium* sont également connus pour être capables de synthétiser des polysaccharides basiques, mais uniquement dans des conditions de culture très précises.

3.6.2.2 Protéines

La part des protéines dans la gaine de *S. natans* est importante puisqu'elle représente 27 % de sa composition (Takeda *et al.*, 1998). Les acides aminés les plus représentés sont la glycine (49,2 %), la cystéine (24,6 %), l'alanine (7,7 %), la glutamine (6,4 %) et la lysine (4,7 %).

Une analyse par SDS-PAGE d'hydrolysats partiels de gaine montre la présence de bandes caractéristiques de protéines ayant une masse moléculaire allant de 18 700 et 30 500.

L'analyse des protéines réalisée par Takeda *et al.* reste cependant très sommaire (Takeda *et al.*, 1998). De plus, dans le protocole de purification de la gaine, il est fait mention d'un traitement à la protéase. Cette dernière peut altérer les protéines présentes et donc fausser l'analyse. Les seuls résidus protéiques qui ont ainsi pu être analysés par ces auteurs sont ceux qui se trouvent enchâssés dans la gaine et donc protégés de l'action de l'enzyme. Après ce traitement, la part des protéines dans la gaine n'est plus que de 12,2 %.

Lors de leurs expérimentations, les auteurs ont mis en évidence que le traitement à la protéase de la gaine purifiée n'altérerait pas sa structure. On peut supposer que la part des protéines qui résiste à ce traitement serait directement impliquée dans la structuration de la gaine en combinaison avec d'autres éléments.

3.6.3 Dégradation de la gaine

Le passage de *S. natans* de la forme filamenteuse à la forme dispersée en culture pure nécessite inévitablement une dégradation, ou au moins une déstructuration, plus ou moins partielle de la gaine polysaccharidique afin que les cellules puissent sortir du filament et recoloniser le milieu. Certains microorganismes possèdent l'équipement enzymatique susceptible de lyser la gaine de *S. natans*.

3.6.3.1 Dégradation par un microorganisme

À l'heure actuelle, deux souches bactériennes ont été identifiées comme pouvant dégrader la gaine de *S. natans*. Ces souches se nomment TB^T et TK (Takeda *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2002b). Des études phylogénétiques ont permis de déterminer qu'elles appartiennent au genre *Paenibacillus*. Les bactéries du genre *Paenibacillus* sont caractérisées par leur capacité à

dégrader un grand nombre de macromolécules telles que des polysaccharides, des acides nucléiques ou des protéines.

Il a donc été proposé de regrouper ces deux souches dans une nouvelle espèce baptisée par les auteurs *Paenibacillus koleovorans* sp. nov. (Takeda *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2002a). En présence d'une source d'azote (protéose-peptone ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ par exemple), elles sont capables de se développer à partir de la gaine de *S. natans* comme source de carbone. Ce qui n'est pas le cas en présence des monosaccharides constitutifs de la gaine, même ajoutés ensemble. Les conditions optimales de dégradation de la gaine se situent à une température de 30°C et à un pH compris entre 7 et 8.

3.6.3.2 Mise en évidence d'une enzyme de dégradation

Une enzyme responsable de la dégradation de la gaine polysaccharidique de *S. natans* a été isolée chez *Paenibacillus koleovorans* sp. nov. (Takeda *et al.*, 2000). Elle dégrade de façon spécifique le polysaccharide de gaine en pentamères ou hexamères. Cette enzyme fait partie des enzymes dites de type éliminase, également appelées lyases. Il s'agit plus précisément d'une lyase des polysaccharides de type endo-lytique. Ces enzymes se caractérisent par leur faculté à hydrolyser les polysaccharides acides en oligosaccharides se terminant par un acide 4-deoxy-5-oxo-uronique.

Cette enzyme, spécifique de la dégradation de la gaine de *S. natans*, serait le seul exemple actuellement connu, de lyase capable d'hydrolyser des polysaccharides basiques.

Le gène codant pour cette enzyme a été identifié chez *P. koleovorans* JCM 11186 (Takeda *et al.*, 2003b). Ce gène, d'une taille de 2217 paires de bases, code pour une séquence de 738 acides aminés, incluant un peptide signal de 34 acides aminés. La protéine mature correspondante serait donc constituée de 704 acides aminés et aurait une masse moléculaire de 78 kDa. Aucune protéine similaire n'a actuellement pu être identifiée dans les bases de données disponibles, ce qui renforce le caractère atypique de cette enzyme de dégradation.

Aux vues des précédentes observations, deux hypothèses peuvent être formulées :

- ✓ Takeda *et al.* (2000) ont réellement identifié une enzyme tout à fait originale
- ✓ La composition de la gaine polysaccharidique n'est pas réellement celle décrite. Elle contiendrait des oses acides permettant l'action d'une enzyme de type lyase.

De plus, il a été décrit que *S. natans* en culture pure était capable de passer d'une morphologie filamenteuse à une morphologie monocellulaire. Ceci implique inévitablement une dégradation plus ou moins partielle de la gaine par la bactérie elle-même. Il est donc probable que *S. natans* possède une enzyme équivalente à celle identifiée chez *P. koleovorans*.

3.7 Les polysaccharides extracellulaires produits par *S. natans*

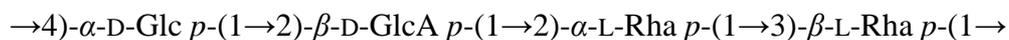
S. natans synthétise également un exopolysaccharide (EPS) entourant la gaine du filament.

3.7.1 Structure et composition

Une première étude (Gaudy & Wolfe, 1962) avait déjà mis en évidence sa présence et permis de déterminer sa composition. D'après les auteurs, cet EPS est composé de glucose, de fucose, de galactose et d'acide glucuronique en quantités équivalentes. Le glucose et l'acide glucuronique formeraient ensemble un acide aldobiuronique. A l'époque, on considérait que cet exopolysaccharide était ensuite assemblé pour former la gaine.

Depuis, de nouveaux travaux ont remis en cause ces résultats (Takeda *et al.*, 2002c). Le polysaccharide extracellulaire entourant la gaine du filament est un polymère constitué d'une unité de répétition composée de glucose, de rhamnose, et d'acide glucuronique dans un ratio moléculaire de 1:1:2.

Ce tétrasaccharide est construit de la façon suivante :



La composition de cet EPS et celle du polysaccharide constitutif de la gaine s'avèrent très différentes. Il est donc très peu probable que le premier soit une forme initiale du second.

3.7.2 Rôle et dégradation du polysaccharide

Cet EPS serait impliqué dans l'adsorption et l'oxydation des métaux par *S. natans*. En effet, la gaine n'a pas elle-même de résidus osidiques acides nécessaires à cet effet.

La présence de ce polysaccharide autour de la gaine ne la protège pas de la dégradation par les souches de *Paenibacillus* qui utilisent cette dernière comme source de carbone (Takeda *et al.*, 2002b).

Un microorganisme utilisant l'exopolysaccharide de *S. natans* comme source de carbone pour se développer, a également été identifié (Takeda *et al.*, 2005). Il s'agit là encore d'une espèce appartenant au genre *Paenibacillus* et qui a été baptisé *P. hodogayensis* sp. nov. D'un point de vue phylogénétique, cette souche présente un degré de similarité de 94,2 % avec *P. koleovorans*.

L'EPS décrit ici est celui qui entoure la forme filamenteuse de *Sphaerotilus natans*, mais la forme monocellulaire possède aussi un EPS qui entoure les cellules. À l'heure actuelle aucune étude ne permet de dire s'il est identique à celui entourant le filament.

3.8 Identification d'un gène essentiel à la filamentation chez *S. natans*

À l'heure actuelle, très peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes de croissance des bactéries sous forme de filament. Cela est aussi bien valable d'un point de vue physiologique (mode d'allongement, cinétique de croissance du filament, coopération des cellules dans le filament), que d'un point de vue moléculaire (enzymes intervenant dans la structuration et déstructuration du filament, gènes codant pour ces enzymes et leurs cascades d'activation).

3.8.1 Identification du gène *sthA*

Cependant, un gène indispensable à la formation du filament a été identifié et nommé *sthA* (Suzuki *et al.*, 2002). Les auteurs ont généré des souches de *S. natans* mutantes par insertion du transposon TN5. Celui-ci, en s'insérant dans leur génome, apporte aux bactéries le gène de résistance à la kanamycine, et inactive le gène dans lequel il s'insère. Parmi près de 20 000 mutants obtenus, 7 étaient incapables de filamenter et de synthétiser une gaine.

Sur l'ensemble de ces mutants, 5 présentaient une mutation dans un même cadre ouvert de lecture (ORF : Open Reading Frame). Le gène correspondant a été baptisé *sthA*. Il correspond à une séquence de 1 407 paires de bases et coderait pour une protéine de 469 acides aminés.

En ce qui concerne les deux autres mutants, pour le premier, la mutation a eu lieu dans une région qui, après comparaison avec les séquences disponibles dans les bases de données, coderait pour une glycosyltransférase. Pour le second, la mutation touche un gène codant pour une ARN hélicase ou d'autres protéines associées à une ARN polymérase.

3.8.2 Comparaison morphologique des mutants-*sthA* et des souches sauvages de *S. natans*

Des disruptions dirigées contre le gène *sthA* ont ensuite été réalisées (Suzuki *et al.*, 2002). Dans tous les cas, les mutants présentent un déficit de synthèse de la gaine et une incapacité à filamenter (cf. Figure 15). Ils se développent uniquement sous la forme monocellulaire, quelque soit les conditions de culture.

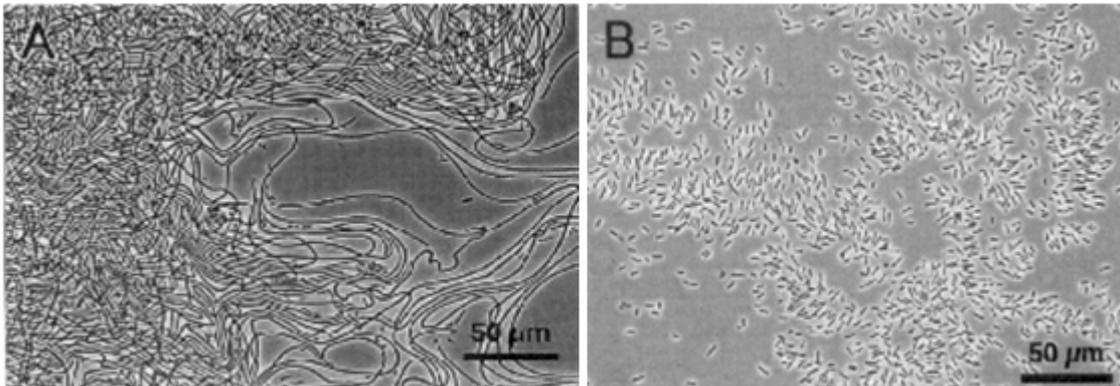


Figure 15 : *S. natans* de A) souches sauvages et B) *sthA* déficiente. Les deux souches sont cultivées sur milieu NB à 0,1 %, induisant normalement la filamentation.

Les mutants *sthA* présentent aussi un défaut de synthèse des exopolysaccharides. En effet, chez les souches sauvages, on observe une production d'EPS autour des bactéries à l'état monocellulaire (cf. Figure 16 A). Ceci n'est plus le cas, ou bien en quantité négligeable chez les mutants *sthA* déficients (cf. Figure 16 B).

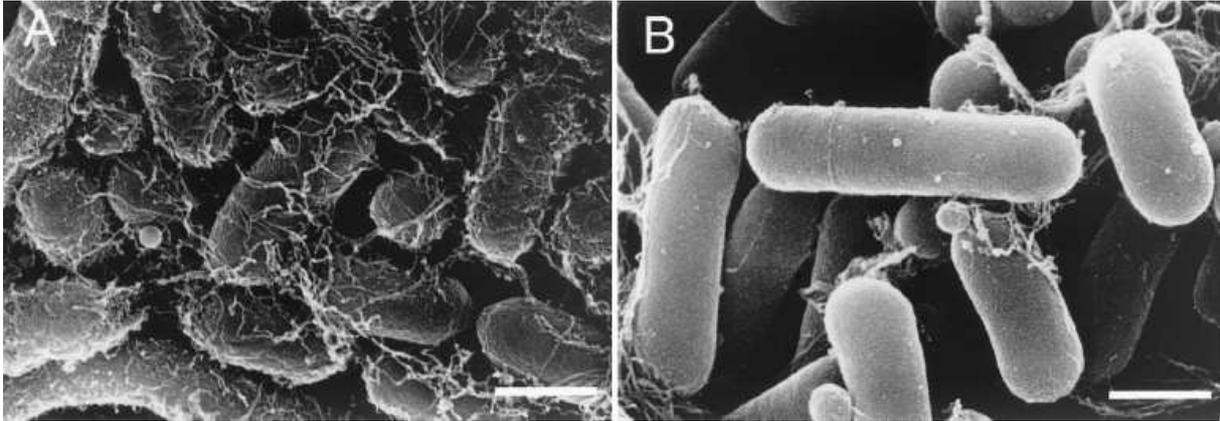


Figure 16 : Observation de cellules dispersées de *S. natans* pour les souches A) sauvages et B) *sthA*-déficiente.

À la lumière de ces résultats, les auteurs ont donc pu dire avec certitude que le gène *sthA* est essentiel à la filamentation et à la synthèse de la gaine.

3.8.3 Expression du gène *sthA*

Dans la même étude, Suzuki et *al.* (2002) ont cherché à déterminer si ce gène nouvellement identifié était exprimé quelque soit la morphologie adoptée par *S. natans*. Ils ont pour cela créé des mutants utilisant la GFP comme gène reporteur de l'expression du gène *sthA*. Il en ressort que ce gène est exprimé à l'état de filaments comme à l'état de cellules dispersées puisque l'expression de GFP est observée dans les deux cas (cf. Figure 17).

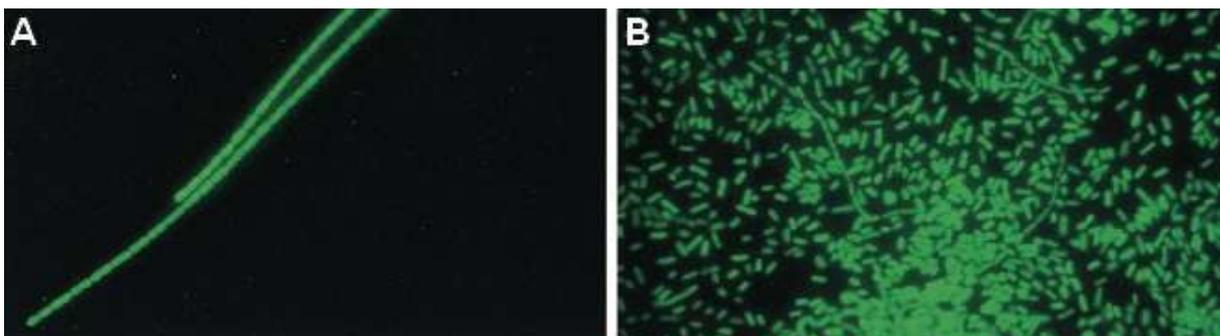


Figure 17 : Expression de la GFP dans les cellules A) filamenteuses, cultivées sur milieu NB 0,1 % et B) dispersées cultivées sur milieu NB 1 % (d'après Suzuki et *al.*, 2002).

Afin de préciser le niveau d'expression de ce gène en fonction de la morphologie, les auteurs ont également étudié l'expression du gène *sthA* par RT-QPCR. Leurs conclusions ont été que l'expression de *sthA* ne variait pas entre la forme filamenteuse et dispersée. Ceci peut sembler

surprenant quand on considère que ce gène est crucial pour la synthèse de la gaine polysaccharidique et le mécanisme de filamentation.

4. Détection, identification et quantification des microorganismes filamenteux

La prolifération excessive de microorganismes au sein des boues activées reflète un problème de fonctionnement de la station d'épuration. Une identification précise des bactéries incriminées peut permettre de fournir aux exploitants des pistes quant à la nature du dysfonctionnement.

4.1 Méthode d'identification classique : observation microscopique

Afin de trouver les moyens d'action les plus appropriés contre un épisode de foisonnement filamenteux ou de moussage, il est au préalable indispensable d'identifier de façon précise les bactéries à l'origine de ce dysfonctionnement. Ainsi Eikelboom (1975) a fourni une méthode d'identification des différents microorganismes filamenteux. Ces derniers y sont classés en fonction des critères morphologiques suivants :

- La présence ou non de gaine ou d'une matrice d'exopolysaccharides autour du filament
- La motilité des cellules
- La présence de ramifications, vraies ou fausses
- La taille et la forme des filaments
- Le résultat de la coloration de Gram et de Neisser
- La morphologie, le diamètre et la longueur des cellules du trichome.
- La présence ou l'absence ainsi que la nature des inclusions intracellulaires (PHB, sulfures)

Ces procédures sont depuis largement utilisées à travers le monde. Cependant ce type d'identification a ses limites. Il nécessite en effet un observateur très expérimenté car un mauvais diagnostic peut facilement être établi.

Des fiches permettant l'identification ont été définies (Jenkins *et al.*, 1984). Elles proposent plusieurs démarches à suivre afin d'identifier avec le plus de précision et de certitude possible les filaments observés en se basant sur différents critères (taille des cellules, colorations cytoplasmiques, autres critères morphologiques).

La caractérisation morphologique présente ainsi de nombreuses limites. En effet, les colorations, et en particulier la coloration de Gram, donne des réponses variables pour certains filaments en fonction de leur état physiologique (Jenkins *et al.*, 2003). Dans certains cas, des variations de la composition des eaux usées peuvent entraîner un changement dans la morphologie des filaments. Il faut également noter que certaines espèces ayant d'ordinaire une gaine entourant leur filament peuvent ne plus en avoir. En effet, les gènes permettant à la bactérie de la synthétiser sont parfois portés par des plasmides. Et en cas de perte de ces derniers, la bactérie perd sa faculté à synthétiser une gaine (Wagner, 1994). Certaines espèces ont des caractéristiques morphologiques très proches et sont donc très difficiles à différencier (Wagner, 1994; Jenkins *et al.*, 2003). Certaines espèces peuvent exister sous forme de bactéries dispersées en plus de la forme filamenteuse. C'est le cas pour *Sphaerotilus natans* (Gaval, 2001), *Microthrix parvicella* (Richard *et al.*, 1985) et *Thiothrix nivea* (Ramoithokang *et al.*, 2006b) notamment.

4.2 Méthodes d'identification moléculaires

Face aux difficultés et aux erreurs pouvant être induites par la méthode d'identification classique, les chercheurs ont développé à partir des années 90 des méthodes d'identification basées sur la biologie moléculaire. Ces techniques s'appuient sur l'analyse de l'ADN et/ou de l'ARN des bactéries. La cible qui a été choisie afin de caractériser au mieux la complexité de la communauté bactérienne, est l'ARNr 16S.

Cette molécule possède le double avantage d'être très abondante et conservée. Mais elle possède également dans sa séquence des régions variables, caractéristiques de chaque espèce ou genre bactérien. Elle permet donc de pouvoir comparer des espèces dans un même domaine, mais aussi de pouvoir différencier les différentes souches d'une même espèce.

4.2.1 PCR et QPCR

La réaction de PCR ou Polymerase Chain Reaction, est la technique qui a révolutionné la biologie moléculaire et est à l'origine de son expansion au cours de ces vingt dernières années. De nombreuses techniques d'identification moléculaire qui seront décrites par la suite sont basées sur l'utilisation de cette réaction. Le principe de la réaction de PCR sera décrit en détail dans le chapitre suivant, on peut cependant dire qu'elle est basée sur l'amplification *in vitro* d'une portion d'ADN donnée à l'aide d'une enzyme, l'ADN polymérase (Mullis & Faloona, 1986). Dans le cas de microorganismes connus, l'amplification d'une séquence de l'ADNr 16S spécifique de l'espèce bactérienne cible peut mettre en évidence sa présence dans un échantillon donnée.

La QPCR ou PCR quantitative en temps réel ajoute un aspect quantitatif à l'identification. En effet, à la différence de la PCR classique, cette technique permet d'estimer la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon à analyser. Cette technique sera également décrite en détail dans le chapitre Matériels et Méthodes.

4.2.2 Clonage d'ARNr 16S

Cette méthode implique une extraction d'ADN à partir de boues, suivie d'une amplification à l'aide d'amorces universelles puis d'un clonage des gènes codant pour l'ARNr 16S des différentes souches bactériennes, la création de banques d'ARNr 16S, et enfin un séquençage des produits de clonage. L'identification des microorganismes est ensuite réalisée en comparant les séquences ainsi obtenues à des bases de données. Actuellement, environ 700 000 séquences d'ADNr 16S sont disponibles sur la base de données du NCBI (septembre 2007). Les séquences des différentes bactéries filamenteuses étant maintenant connues, elles sont facilement détectables et identifiables par cette méthode.

Cependant, cette technique nécessite beaucoup de temps, en particulier l'étape de clonage indispensable lorsque l'on travaille dans une matrice complexe telle que des boues activées. Cette technique est donc peu adaptée à l'analyse d'échantillons en grand nombre.

4.2.3 FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization)

Cette technique, très largement utilisée en écologie microbienne est basée sur l'utilisation de courtes séquences d'ADN (de 16 à 20 nucléotides en général), marquées en leur extrémité 5' par un fluorophore. On appelle aussi cet oligonucléotide une sonde. La séquence est définie afin d'être complémentaire d'une séquence de l'ARNr 16S (à l'exception de quelques sondes comme Bet 42a et Gam 42a qui ciblent une partie de l'ARNr 23S) de la bactérie ou du groupe bactérien cible. Les sondes peuvent être spécifiques d'un domaine, d'une famille ou d'une souche. Le Tableau 4 présente un exemple de sondes les plus utilisées en microbiologie et présentant différents niveaux de spécificité.

Cibles	Nom de la sonde	Séquence de la sonde (5'-3')	Références
La plupart des bactéries	EUB 338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
Planctomycetales	EUB 338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
Verrucomicrobiales	EUB 338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	(Daims <i>et al.</i> , 1999)
α -protéobactéries	ALF1B (68% des α -protéobactéries)	CGT TCG YTC TGA GCC AG	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
β -protéobactéries	BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
γ -protéobactéries	GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	(Manz <i>et al.</i> , 1992)
Flavobactéries	CFB563 (84 % des flavobactéries)	GGA CCC TTT AAA CCC AAT	(Weller <i>et al.</i> , 2000)
Cyanobactéries	CYA361	CCC ATT GCG GAA AAT TCC	(Schönhuber <i>et al.</i> , 1999)
α -protéobactéries filamenteuses	Nost993	CAG CCG AAA CGG GCA TGT	(Kragelund <i>et al.</i> , 2006)
<i>S. natans</i>	SNA	CAT CCC CCT CTA CCG TAC	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)

Tableau 4 : Exemple de sondes FISH employées en écologie microbienne et présentant différents niveaux de spécificité.

Des sondes ciblant les principales espèces bactériennes filamenteuses ont également été mises au point (cf. Tableau 5).

Bactéries filamenteuses	Nom de la sonde	Séquences (5'-3')	Références
<i>H. hydroxsis</i>	HHY	GCC TAC CTC AAC CTG ATT	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)
<i>S. natans</i>	SNA	CAT CCC CCT CTA CCG TAC	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)

<i>T. nivea</i>	TNI	CTC CTC TCC CAC ATT CTA	(Wagner <i>et al.</i> , 1994),
	G123T	CCT TCC GAT CTC TAT GCA	(Kanagawa <i>et al.</i> , 2000)
Type 021N	G1B	TGT GTT CGA GTT CCT TGC	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)
	G2M	GCA CCA CCG ACC CCT TAG	
	G3M	CTC AGG GAT TCC TGC CAT	
Type 1863	ACA652	ATC CTC TCC CAT ACT CTA	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)
<i>M. parvicella</i>	MPA	CCG GAC TCT AGT CAG AGC	(Erhart <i>et al.</i> , 1997)
<i>N. limicola I</i>	NLIMI 91	CGC CAC TAT CTT CTC AGT	(Liu & Seviour, 2001)
<i>N. limicola II</i>	NLIMII 175	GGC TCC GTC TCG TAT CCG	(Liu & Seviour, 2001)
<i>N.a limicola III</i>	NLIMIII 301	CCC AGT GTG CCG GGC CAC	(Liu & Seviour, 2001)

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des sondes spécifiques des bactéries filamenteuses les plus fréquemment rencontrées en boues activées.

La sonde est ensuite mise en présence des cellules fixées, et l'hybridation des deux séquences homologues se fait *in situ* (cf. Figure 18). Il est possible d'utiliser plusieurs sondes en même temps. En effet, l'observation se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence qui éclaire l'échantillon avec une lumière de longueur d'onde donnée, et recueille la lumière émise par les bactéries cibles rendues fluorescentes, en général de longueur d'onde supérieure, permettant d'observer uniquement les sites hybridés. À l'aide de jeux de filtres optiques, il est ainsi possible d'observer plusieurs fluorophores aux caractéristiques optiques différentes, et donc de distinguer les différentes sondes hybridées sur un même brin d'ARNr.

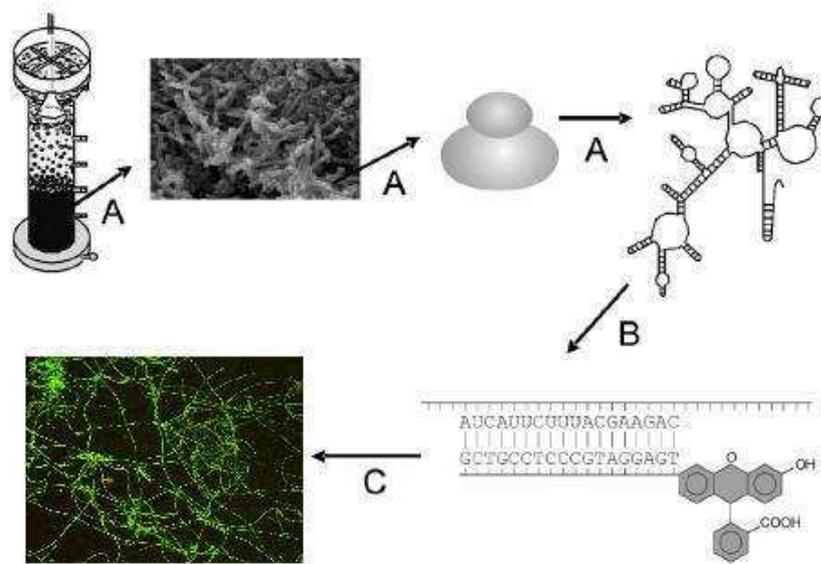


Figure 18 : Schéma général du principe de la technique FISH. L'hybridation *in situ* peut-être divisée en 4 étapes : **A)** échantillonnage et fixation des cellules par éthanol ou formaldéhyde, **B)** hybridation de la séquence cible de l'ARNr 16S avec la ou les sonde(s) spécifique(s) couplée(s) à un fluorophore. **C)** L'observation des séquences hybridées s'effectue à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Sanz & Köchling, 2007)

Cette technique permet donc d'identifier des cellules viables mais non cultivables et de les localiser dans un écosystème complexe. Des articles ont déjà montré que la technique FISH était très efficace pour la détection de bactéries filamenteuses comme *Thiothrix* ou Eikelboom type 021N dans des boues activées (Pernelle *et al.*, 1998) par exemple.

De nouvelles techniques d'hybridation basées sur le même principe apparaissent. L'une des plus récentes est le CARD FISH pour CAtalysed Reporter Deposition FISH (cf. Figure 19). Elle permet d'augmenter de façon très importante l'intensité du signal (Bobrow *et al.*, 1989). Dans ce cas, la sonde n'est pas directement liée à un fluorochrome, mais de façon covalente à une enzyme HRP (peroxydase du raifort). Après l'hybridation, dans une phase dite d'amplification, cette enzyme catalyse la formation de radicaux tyramides marqués par un fluorochrome. Ces derniers se lient aux régions riches en tyrosine des ribosomes. Grâce à cette phase d'amplification, l'intensité du signal est augmentée par une fixation massive des tyramides marqués.

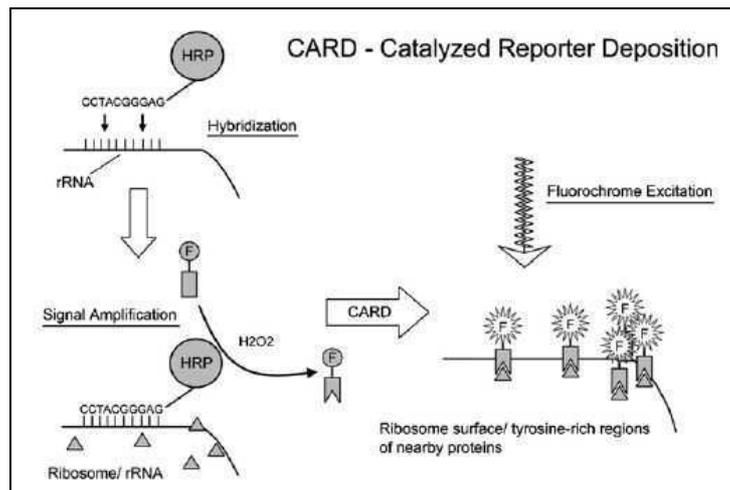


Figure 19 : Description schématique du principe de la technique CARD-FISH (Sanz & Köchling, 2007)

Le défaut majeur de cette technique est qu'elle ne permet pas la détection de plusieurs sondes en même temps.

4.2.3.1 Les limites de la technique FISH :

Dans certains cas, la technique FISH est également utilisée pour quantifier certains microorganismes dans l'échantillon (Gaval & Pernelle, 2003; Olivier, 2005). Des protocoles de quantification de microorganismes par analyse d'images FISH (Zeng *et al.*, 2003; Daims & Wagner, 2007) ont également été décrits. Cette technique a notamment été utilisée pour suivre

l'évolution des populations des différentes espèces de bactéries filamenteuses dans les boues suite à l'application d'un stress (Gaval *et al.*, 2000a; Gaval & Pernelle, 2003). Malheureusement, on observe régulièrement une discordance entre les résultats de quantification obtenus par analyses FISH, et ceux obtenus par d'autres techniques de quantification telles que la PCR quantitative en temps réel (QPCR) par exemple (Olivier, 2005b).

Mais dans certains cas, il est difficile de trouver une alternative à l'utilisation de la technique FISH pour quantifier un microorganisme particulier dans un environnement complexe. Il a très longtemps été admis que le taux d'ARNr restait très stable au cours du temps et de la croissance cellulaire. Pourtant, certains auteurs ont mis en évidence que cette variation de l'intensité du signal FISH semblerait être liée à des modifications du taux d'ARNr intracellulaire. Cependant, les études aboutissant à cette conclusion ont été menées en estimant la quantité d'ARNr à l'aide de sondes fluorescentes (Kerkhof & Ward, 1993; Binder & Liu, 1998). Une autre hypothèse serait qu'en fonction de l'état physiologique de la cellule, l'ARNr cible serait plus ou moins accessible à la sonde. Ainsi ce ne serait pas nécessairement la quantité d'ARN ribosomique qui change au cours de la croissance, mais la capacité de la sonde à aller s'hybrider avec sa séquence cible et donc à émettre de la fluorescence.

4.2.4 Techniques d'empreintes génétiques

Ces techniques de biologie moléculaire dites d'empreintes génétiques (genetic fingerprinting) permettent de fournir un aperçu ou profil de la diversité d'une communauté bactérienne. Dans ce paragraphe, les principales techniques d'analyse génétique employées dans le domaine de l'écologie microbienne vont être décrites.

- ***DGGE (Denaturant Gradient Gel Electrophoresis)***

La technique de DGGE (Muyzer *et al.*, 1993) est très certainement la plus répandue en ce qui concerne l'étude des populations microbiennes. Son principe relativement simple est basé sur la mobilité différentielle de fragment d'ADN de même taille, mais de séquences nucléotidiques différentes. L'ADN de l'échantillon est extrait puis une portion du gène de l'ARNr 16S est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces universelles. Les molécules d'acides nucléiques ainsi obtenues migrent sur un gel de polyacrylamide où elles rencontrent des concentrations croissantes d'agents dénaturants (Urée + Formamide). La dissociation

transforme le fragment d'ADN en une structure partiellement ouverte et crée une diminution brutale de sa mobilité, qui conduit l'ADN à se concentrer en un point du gel. La migration des molécules est de ce fait très dépendante de la séquence et en particulier de sa composition en AT et GC.

Le nombre de bandes ainsi obtenu sur le gel correspond aux espèces bactériennes dans l'échantillon. En association avec le séquençage des bandes ainsi obtenues et une analyse phylogénétique, cette méthode donne un très bon aperçu de la diversité de la communauté microbienne (cf. Figure 20).

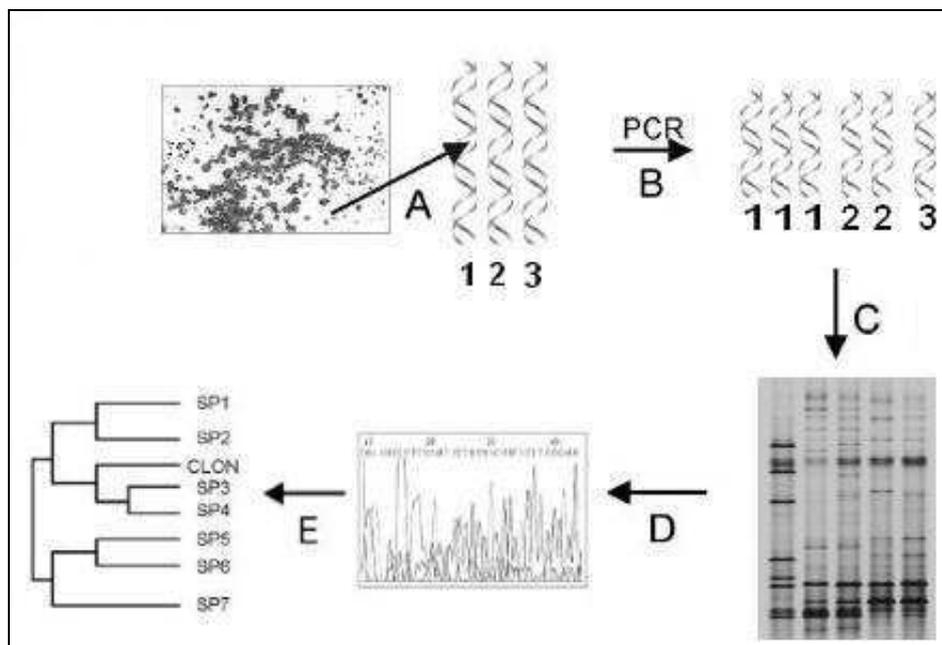


Figure 20 : Schéma du principe de l'analyse par DGGE. A) L'ADN des différentes espèces bactériennes (1, 2 et 3) est extrait à partir de l'échantillon d'intérêt, puis B) une partie du gène de l'ARNr 16S est amplifié par PCR à l'aide d'amorces universelles. C) les molécules d'ADN migrent ensuite sur un gel de polyacrylamide présentant des concentrations croissantes de dénaturants. Les différentes bandes obtenues correspondent aux principales espèces bactériennes dans l'échantillon. D) Elles peuvent ensuite être découpées puis séquencées, E) permettant une analyse phylogénétique de la population microbienne (d'après Sanz & Köchling, 2007).

En créant un référentiel à l'aide de souches pures, il est possible par la suite d'identifier et de suivre l'évolution de certaines espèces dans des environnements complexes.

Cependant cette technique n'est pas exhaustive et est plutôt destinée à mettre en évidence les membres dominants de la population bactérienne considérée. Elle est également tout à fait adaptée au suivi de l'évolution dynamique d'une population, comme par exemple les bactéries filamenteuses.

- ***TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis)***

Le principe de l'analyse d'une population par TTGE est le même que celui de la DGGE. Le gel ne présente plus de gradient de dénaturant, mais un gradient de température au cours de la migration des molécules.

- ***ARISA***

La technique ARISA (Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) est utilisée pour l'étude de la structure génétique des consortiums bactériens associés à des milieux complexes (Fisher & Triplett, 1999). Cette méthode exploite le polymorphisme de la longueur de l'espace intergénique ou ITS (Intergenic Transcribed Spacer) entre les gènes *rrs* (codant pour l'ARNr16S) et *rrl* (codant pour l'ARNr 23S). Le polymorphisme de taille de l'ITS varie pour la grande majorité des espèces de procaryotes entre 74 paires de bases (espèces appartenant aux Firmicutes à faible teneur en base GC) et 1529 paires de bases (sous-division des α -Protéobactéries). A partir de l'ADN extrait des consortiums bactériens, les ITS sont amplifiés à l'aide d'amorces universelles permettant de cibler l'ensemble des taxons présents au sein de l'échantillon. L'une des amorces est marquée par un fluorochrome. Après amplification et séparation des fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'acrylamide selon leur taille, on obtient un profil composé de bandes d'intensité variable, dont l'intensité reflète approximativement l'abondance des individus.

- ***T-RFLP***

La technique de T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) est également une technique de fingerprinting. Son développement est lié à celui des séquenceurs à capillaires. Le principe est assez similaire à celui de l'ARISA puisque dans ce cas on réalise également une PCR à l'aide d'amorces marquées par des fluorophores. Mais ici les produits de PCR sont ensuite digérés par des enzymes de restriction. Des modifications des séquences génomiques vont générer ou éteindre des sites de restriction. Ainsi chaque espèce bactérienne aura un fragment terminal d'une taille qui lui est spécifique. Après digestion, la taille des

fragments terminaux, et marqués par le fluorophore, est déterminée grâce à une électrophorèse capillaire. L'analyse des profils ainsi obtenus permet d'avoir une idée de la population bactérienne présente dans l'échantillon.

- ***D-HPLC (Denaturing High Performance liquid Chromatography)***

L'HPLC en condition dénaturante est une technique de chromatographie appliquée à l'analyse génétique. Les produits de PCR sont soumis à une chromatographie liquide haute performance dénaturante en phase inverse par formation de paires d'ions au sein d'une colonne contenant des particules alkylées non poreuses. Dans des conditions dénaturantes partielles (gradient linéaire d'acétonitrile), les hétéroduplexes formés par les produits de PCR contenant une variation de séquence présentent un temps de rétention plus faible au sein de la colonne que leurs homoduplexes correspondants. L'identification d'échantillons présentant un polymorphisme est réalisée grâce à l'analyse des profils d'élution. Les avantages majeurs de cette technologie sont l'automatisation, la rapidité de l'analyse (moins de 5 min par échantillon) et la taille des fragments d'ADN analysables (jusqu'à 1 500 paires de bases).

- ***Limitations de ces techniques***

Le choix des amorces de PCR est une étape primordiale et complexe de l'analyse par TTGE et DGGE. De plus les fragments d'ADN analysés doivent être relativement courts, c'est-à-dire d'une taille de 500 paires de bases au maximum. Certains artefacts éventuels de PCR peuvent également entraîner des erreurs d'interprétation.

Parfois, il est difficile, voire impossible de séparer certains fragments d'ADN ayant pourtant des séquences différant de plusieurs bases. À l'inverse, dans certains cas un produit de PCR issu d'une souche va aboutir au final sur le gel, à l'observation de plusieurs bandes. Ceci est souvent dû à l'utilisation d'amorces dégénérées qui vont produire des produits de PCR très légèrement différents et qui seront séparés en conditions dénaturantes (Kowalchuk *et al.*, 1997).

Dans certains cas, la création de référentiels est complexe à mettre en place puisque certaines souches ne peuvent être cultivées.

Ces techniques ne mettent en évidence que les fragments d'ADNr 16S des souches prédominantes dans l'échantillon considéré. Pour un échantillon très complexe tel que des boues activées ou du sol, seules les souches bactériennes représentant plus de 1 % des espèces présentes sont mises en évidence par DGGE.

4.2.5 Analyses par Microarray ou puce à ADN

Le concept des puces à ADN, aussi désigné sous le terme de biopuce ou Microarray, est né dans les années 90. Il repose sur une technologie pluridisciplinaire intégrant la micro-électronique, la chimie des acides nucléiques, l'analyse d'image et la bioinformatique. Le principe des Microarrays est basé sur l'hybridation des acides nucléiques (cf. Figure 21).

D'une part des oligonucléotides spécifiques des espèces cibles sont fixés sur un support solide (matrice) et forment des spots. D'autre part des ADN de ces mêmes souches cibles sont digérés par des enzymes de restriction et marqués à l'aide d'un fluorochrome. Les ADN extraits de l'échantillon à analyser sont digérés de la même façon et marqués à l'aide d'un autre fluorochrome émettant à une longueur d'onde différente. Les ADN de référence et de l'échantillon sont ensuite mis en contact avec les oligonucléotides fixés sur la puce. La présence des bactéries d'intérêt dans l'échantillon est révélée en analysant l'intensité de fluorescence correspondant à chacun des fluorophores pour chaque spot.

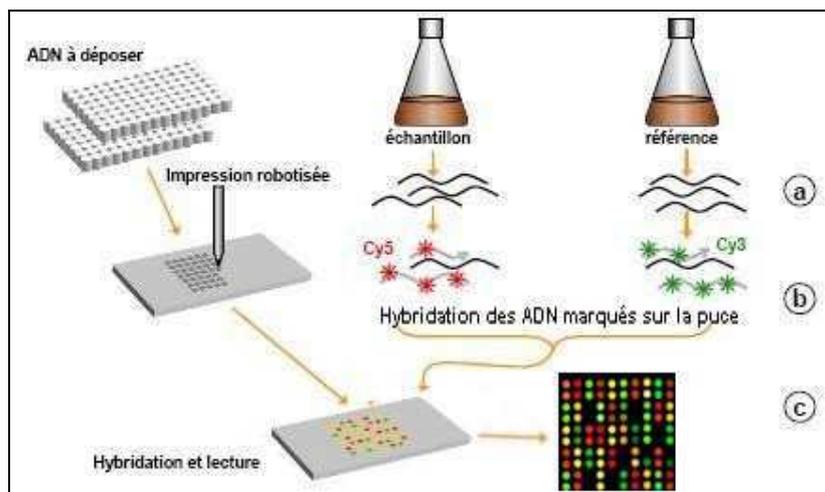


Figure 21 : Principe de la puce à ADN ou Microarray : En parallèle de la fabrication de la puce, a) les ADN de référence et de l'échantillon à analyser sont extraits et b) marqués à l'aide de fluorophores différents (ici Cy5 et Cy3). Ces fragments d'ADN marqués sont hybridés sur la puce puis c) une lecture optique permet de mesurer la fluorescence pour chaque spot. Les données sont ensuite analysées par un logiciel de traitement d'image.

Cette technique permet, simultanément à l'identification d'une espèce dans un échantillon complexe, de mesurer l'abondance du microorganisme en se basant sur l'intensité de fluorescence.

La Microarray est déjà utilisée pour l'analyse bactérienne de l'eau de consommation. Cette technique a également été appliquée à l'étude des boues activées (Byoung *et al.*, 2004). Elle représente un moyen très puissant et rapide d'identification des bactéries présentes dans un échantillon complexe. Cependant la mise au point d'une puce est encore lourde et onéreuse.

5. Conclusion

Cette synthèse bibliographique a permis de souligner l'importance des bactéries filamenteuses dans l'écosystème des boues activées, que ce soit par le rôle essentiel qu'elles y jouent ou bien par les graves dysfonctionnements qu'elles peuvent engendrer. Les moyens actuellement disponibles pour surveiller et détecter les risques de survenue des événements de bulking sont très limités, et leur degré d'anticipation très restreint. Les mesures d'indice de boue, l'observation microscopique et l'analyse FISH sont les seuls moyens disponibles pour apprécier l'importance et la nature des populations filamenteuses. L'évaluation des effectifs par ces différentes méthodes reste encore très approximative. Maintenant que les facteurs induisant une croissance excessive de ces microorganismes ont pour la plupart été bien identifiés, il est indispensable d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires et physiologiques de la formation du filament. En effet, comme nous avons pu le constater au cours de cette revue bibliographique, très peu d'informations, sont à l'heure actuelle, disponibles sur les mécanismes moléculaires et physiologiques à l'origine de cette forme de croissance particulière. Leur compréhension est essentielle pour déterminer des moyens de lutte efficaces contre les épisodes de foisonnements filamenteux.

Les travaux ici présentés se divisent en 2 parties distinctes. La première consiste en une étude des mécanismes physiologiques et moléculaires qui conduisent à la filamentation chez cette bactérie modèle que constitue *S. natans*. Pour cela nous avons :

- ✓ Déterminé le comportement des différentes souches de cette espèce en jouant sur différents facteurs de cultures.

- ✓ Déterminé si le mode d'allongement du filament repose sur une succession de divisions cellulaires ou un chaînage de microorganismes dispersés.
- ✓ Mis en évidence la présence et déterminé la séquence du gène *sthA*, essentiel au processus de filamentation, pour les différentes souches de *S. natans*. Son niveau d'expression en fonction de la morphologie de la bactérie a ensuite été étudié.
- ✓ Mis au point une méthode de quantification de *S. natans* en boues activées par PCR quantitative en temps réel en utilisant le gène *sthA* comme cible.
- ✓ Déterminé de nouvelles molécules cibles pouvant intervenir plus ou moins directement dans le mécanisme de filamentation de *S. natans* par une étude de l'expression protéique basée sur l'utilisation de la LC-MS-MS.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, nous décrirons la façon dont nous avons mis en évidence une importante variation de la quantité d'ARN ribosomique intracellulaire au cours du cycle de croissance de différents microorganismes, dont *S. natans*. Cette variation va avoir un impact conséquent sur l'intensité du signal FISH et sur les résultats de quantification basés sur l'utilisation de cette technique, et notamment en ce qui concerne la quantification de microorganismes en matrice complexe, telle que celle des filaments dans des boues activées.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

1. Techniques de Microbiologie

1.1 Souches utilisées

1.1.1 Sphaerotilus natans

Aux cours de nos différents travaux, nous avons travaillé avec plusieurs souches de *Sphaerotilus natans* dont cinq sont issues de collections publiques :

- ✓ ATCC 13338T : c'est la souche de référence de *Sphaerotilus natans*. Elle a été isolée à partir d'eau de rivière.
- ✓ ATCC 13929 : cette souche a été isolée à partir de boues activées
- ✓ ATCC 15291 : c'est la souche qui a été la plus étudiée à l'heure actuelle. Elle a été isolée à partir de biofilms issus d'une papeterie.
- ✓ ATCC 29329 et 29330 : ces souches ont été isolées à partir de l'eau d'un étang à Gottingem en Allemagne

1.1.2 Sphaerotilus natans Roxane

Nous avons de plus étudiée une souche de *Sphaerotilus natans* que nous avons isolée par micromanipulation, et appelée Roxane. Elle provient de boues d'une station d'épuration traitant des effluents de type agro-alimentaire c'est à dire très riches en carbone (sucres) et donc particulièrement adaptés au développement de *Sphaerotilus natans*.

1.1.3 Leptothrix

Nous avons également travaillé avec des souches de *Leptothrix* :

- ✓ EU23 : *Leptothrix discophora*, issue d'une collection privée a été isolée par Caterina Levantesi (Water Research Institute, CNR ROME) et gracieusement fournie par le Pr Valter Tandoï (CNR, ROME).
- ✓ DSM 10617 : souche commerciale de *Leptothrix mobilis*. Cette souche a été isolée à partir de sédiments de rivière.

1.1.4 Autres Microorganismes

Dans le cadre de nos travaux, nous avons aussi étudié les microorganismes suivants :

- ✓ *Lactobacillus delbruekii* : la souche que nous avons utilisée est la CNRZ 208T. Elle intervient directement dans la fabrication des yaourts. Cette souche a été gracieusement fournie par l'INRA de Jouy-en-Josas.
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae* : Nous avons travaillé sur la souche L2056. Cette souche a été isolée par l'Institut Français du Vin (ITV) dans les Côtes du Rhône, et est très utilisée dans le domaine vinicole. Ce microorganisme, qui intervient dans la fermentation alcoolique, a été sélectionné pour ses propriétés très intéressantes : conservation des arômes et des goûts des cépages, faible production de SO₂, préservation de la couleur des vins.

1.2 Cultures des microorganismes

Dans cette section nous décrirons les milieux^d utilisés ainsi que les conditions de culture pour les différentes souches.

1.2.1 Milieux et conditions de culture

1.2.1.1 *Sphaerotilus natans*

❖ Milieux de culture

Pour la culture de cette souche, nous avons utilisé 2 milieux différents :

CGYA : C'est le milieu de référence décrit par l'ATCC (1992) pour la culture des différentes souches de *Sphaerotilus natans*. Ce milieu se présente à l'origine sous forme de bouillon dont la composition est la suivante :

^d Tous les milieux sont autoclavés 15 minutes à 120°C avant d'être utilisés pour la culture des microorganismes.

- Casitone.....5 g.L⁻¹
- Glycérol.....10 g.L⁻¹
- Extrait de levure.....1 g.L⁻¹

Une gélose dérivée du bouillon a été produite en ajoutant de l'agar à raison de 1,25% (m/v).

NB (Nutrient Broth) : ce milieu a été utilisé pour la culture de *Sphaerotilus natans* par Suzuki *et al.* (2002). C'est un milieu lyophilisé prêt à l'emploi que l'on utilise d'ordinaire à une concentration de 0,8 % (8 g de milieu lyophilisé pour 1 litre d'eau). On peut aisément faire varier sa concentration et ainsi induire la croissance du microorganisme sous forme monocellulaire ou de filament.

Composition de milieu :

- Extraits de viande.....3 g.L⁻¹
- Peptones.....5 g.L⁻¹

Il est également possible d'obtenir une gélose dérivée de ce milieu en ajoutant de l'agar à une concentration de 1,25 % (m/v).

Au cours de ces travaux, le milieu NB a été utilisé à des concentrations de 0,05 ; 0,1 ; 0,5 et 1%.

❖ Conditions de culture

Avec les milieux CGYA et NB, les cultures ont été réalisées en étuve à 30°C, sous agitation et dans des Erlenmeyer à triple baffles. Ils sont fermés à l'aide de bouchons en cellulose autoclavés, laissant uniquement passer l'air.

Avec les géloses dérivées des milieux CGY et NB, la culture est également réalisée en étuve à 30°C.

1.2.1.2 *Leptothrix*

❖ Milieus de culture :

Pour les 2 souches de *Leptothrix*, un milieu liquide (1503) et un milieu solide (803) ont été utilisés.

Milieu 1503 : ce bouillon a été décrit par l'ATCC pour la culture de *Leptothrix*.

Composition du milieu :

- Peptone.....0,5 g.L⁻¹
- Extraits de levure.....0,5 g.L⁻¹
- Glucose.....0,5 g.L⁻¹
- MgSO₄·7H₂O.....0,6 g.L⁻¹
- CaCl₂·2H₂O.....0,07 g.L⁻¹
- HEPES.....3,57 g.L⁻¹
- MnSO₄.....17 mg.L⁻¹

Le pH final doit être ajusté à 7,3.

Milieu 803 : ce milieu a été défini par le DSMZ comme étant destiné à la culture de *Leptothrix* et *Sphaerotilus*.

Composition du milieu :

- Extraits de levure.....1 g.L⁻¹
- Peptones.....1,5 g.L⁻¹
- MgSO₄·7H₂O.....0,2 g.L⁻¹
- CaCl₂.....0,05 g.L⁻¹
- Citrate d'ammonium ferrique.....0,5 g.L⁻¹
- MnSO₄·H₂O.....0,05 g.L⁻¹
- FeCl₃·6H₂O.....0,01 g.L⁻¹
- Agar.....20 g.L⁻¹

Le pH final est ajusté à 7,1.

❖ Conditions de culture :

Les conditions de cultures sont identiques à celles de *Sphaerotilus natans*.

1.2.1.3 *Lactobacillus delbruekii*

❖ Milieu de culture :

Le milieu MRS a été employé pour la culture de *Lactobacillus delbruekii*. Ce milieu lyophilisé est prêt à l'emploi.

Composition du milieu MRS :

- Peptone de viande.....10 g.L⁻¹
- Extraits de viande.....8 g.L⁻¹
- Extraits de levure.....4 g.L⁻¹
- Acétate de sodium.....5 g.L⁻¹
- Hydrogénophosphate de potassium.....2 g.L⁻¹
- Citrate d'ammonium.....2 g.L⁻¹
- Sulfate de magnésium.....0.2 g.L⁻¹
- Sulfate de manganèse.....0.05 g.L⁻¹
- Glucose.....20 g.L⁻¹
- Tween 80.....1mL

❖ Conditions de culture :

La culture est réalisée en fermenteur à 42°C et sous agitation.

1.2.1.4 *Saccharomyces cerevisiae* 2056

❖ Milieu de culture :

Le milieu de Sabouraud est utilisé pour la culture de ce microorganisme. Ce milieu contenant principalement de la peptone de viande (7 g.L⁻¹) et du glucose (20 g.L⁻¹)¹ se présente sous la forme lyophilisée.

La préparation d'un litre de milieu nécessite l'utilisation de 60 g de lyophilisat et, dans notre cas, 130 g de glucose ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 150 g.L⁻¹.

❖ Conditions de culture :

La culture est réalisée en milieu de Sabouraud à 28°C et sous agitation.

1.2.2 Culture en Bioréacteurs

Pour une partie de nos travaux, des cultures en bioréacteurs ont dû être réalisées. Ces cultures sont de type Batch, c'est-à-dire qu'il n'y a pas d'apport de substrat au cours de la culture. La croissance des microorganismes s'arrête donc lorsque le substrat est épuisé.

Elles ont été faites au sein du laboratoire de Microbiologie Industriels du Pr. BOUIX à l'ENSIA/AgroParisTech Massy. Ces cultures ont été réalisées avec les souches *Sphaerotilus natans* 15291 et 29330, *Lactobacillus delbruekii* et *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.2.1 Les fermenteurs

Les fermenteurs Set 2M (Inceltech) d'une capacité de 2 L, sont remplis avec 1,6 L du milieu approprié pour la culture de chaque souche. Ils sont ensuite autoclavés à 120°C pendant 20 minutes. Au cours de la culture, la température est régulée, le pH est mesuré et dans certains cas régulé, et le milieu maintenu sous agitation constante (cf. Figure 22).

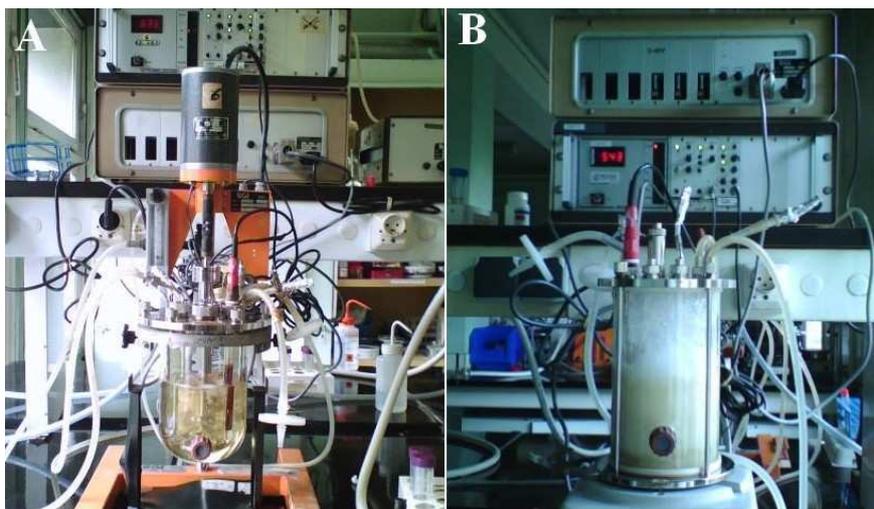


Figure 22 : Fermenteurs utilisés lors des travaux. A) fermenteurs de 2L à fond arrondi et agitation par une hélice située juste au dessus du diffuseur d'air. B) fermenteurs cylindriques à fond plat et à agitation par une hélice située tout en bas du réacteur et au dessous du diffuseur d'air.

1.2.2.2 Les conditions de culture des différentes souches

✓ *Sphaerotilus natans* :

Les fermenteurs sont remplis avec 1,6 L de milieu CGYA. La température est régulée à 30°C. Le pH est mesuré tout au long de la culture mais n'est pas régulé. Étant donné qu'il s'agit de bactéries aérobies, un apport d'air est également fourni. La culture est agitée à une vitesse de 300 rpm afin de maintenir les microorganismes en suspension.

L'inoculum utilisé pour ensemer le réacteur est issu d'une culture fraîche, âgée de 16 heures en milieu CGYA à 30°C.

✓ *Lactobacillus Delbruekii* :

Les fermenteurs sont remplis avec 1,6 L de milieu MRS. La température est régulée à 42°C. Le pH est mesuré tout au long du suivi mais n'est pas régulé. La culture est agitée par une hélice à 140 rpm. La culture est réalisée en conditions fermentatives.

L'inoculum utilisé pour ensemer le réacteur est issu d'une culture fraîche, âgée de 16 heures en milieu MRS à 42°C.

✓ *Saccharomyces cerevisiae* :

Les fermenteurs sont remplis avec 1,6L de milieu de Sabouraud à une concentration finale en glucose de 150 g.L⁻¹. Le pH est régulé à 4,0 grâce à du NaOH 2N au cours du suivi. La température est régulée à 28°C et le milieu est maintenu sous agitation constante (140 rpm).

L'inoculum utilisé pour ensemer le réacteur est issu d'une culture fraîche, âgée de 16 heures en milieu de Sabouraud à 28°C.

1.3 Isolement par micromanipulation

La micromanipulation a été assurée grâce à l'utilisation d'une station InjectMan® NI 2 (Eppendorf) reliée à un micro-injecteur manuel de type Celltram® Oil (Eppendorf). Ces équipements sont montés sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200M (cf. Figure 23).

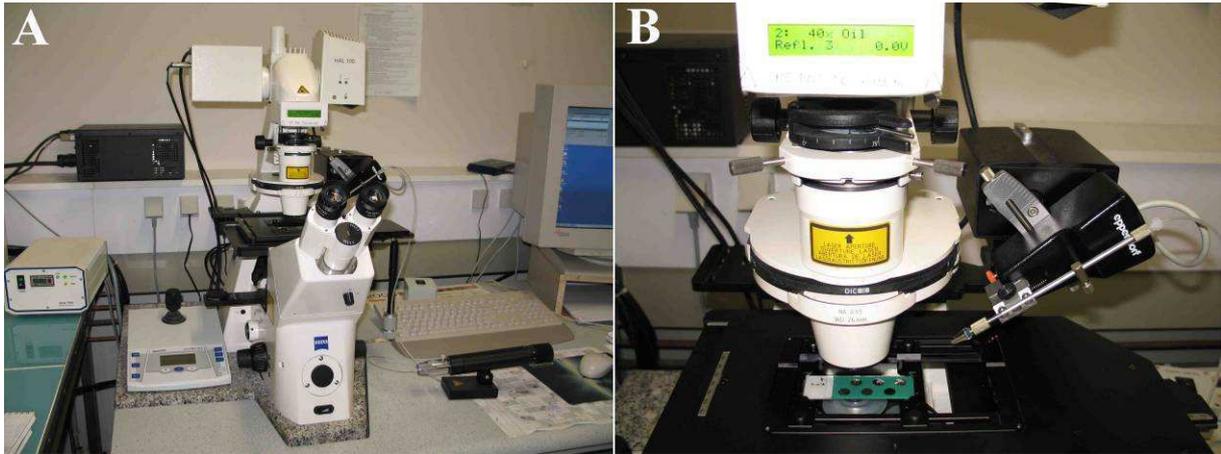


Figure 23 : A) Microscope Zeiss Axiovert 200M équipé d'une station InjectMan® NI 2 et d'un micro-injecteur CellTram® Oil. B) Porte-capillaire relié au CellTram® Oil.

L'isolement des microorganismes a été réalisé par aspiration à l'aide du micro-injecteur dans un capillaire en verre (CustomTips type II, Eppendorf) d'un diamètre interne de 5 μm (cf. Figure 24). Ces micropipettes en verre sont à l'origine dédiées à la contention d'ovocytes, mais il s'avère que ce sont également les plus adaptées à l'isolement de microorganismes.

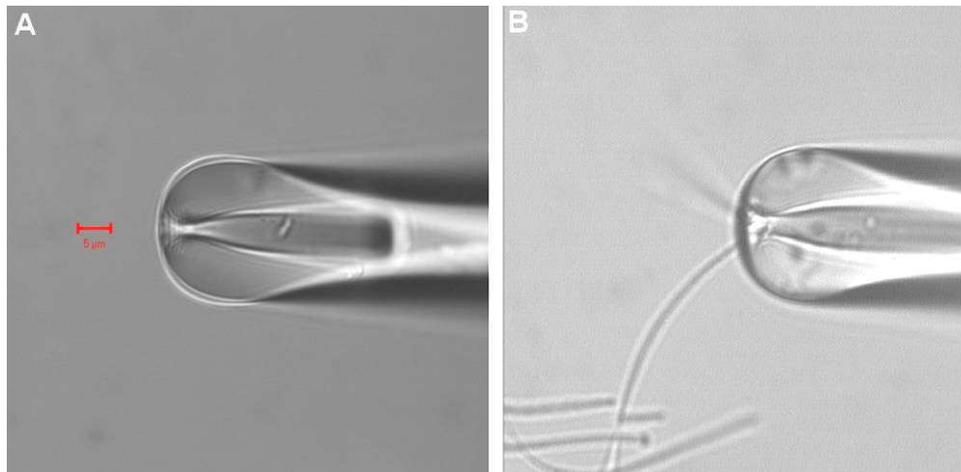


Figure 24 : Isolement par micromanipulation de bactéries en culture pure A) à l'état unicellulaire, ou B) sous forme de filament par aspiration.

Le protocole mis en place pour l'isolement de microorganismes en boues activées à l'aide de cette technique sera plus largement détaillé dans la partie résultats.

2. Techniques de Biologie moléculaire

2.1 *Extraction d'acides nucléiques*

L'étape d'extraction des acides nucléiques est primordiale en ce qui concerne les différentes techniques de biologie moléculaire. C'est en effet de la qualité des ADN et ARN extraits que va dépendre la qualité des résultats obtenus.

2.1.1 ADN

Aussi bien à partir de cultures pures que de boues activées, les acides désoxyribonucléiques ont été extraits à l'aide du kit PowerSoil Mobio (Ozyme, Saint Quentin-en-Yvelines, France). Ce procédé permet d'extraire l'ADN de façon rapide et simple à partir d'échantillons environnementaux dits " sales ", comme le sont les boues activées. Il permet notamment l'élimination des inhibiteurs de PCR tels que les acides humiques. Des tests réalisés avec différents kits d'extraction ont permis de déterminer que celui-ci, permettait d'obtenir le meilleur rendement d'extraction et un ADN d'excellente qualité.

Le kit PowerSoil DNA permet l'extraction d'ADN à partir d'une quantité de matériel pouvant aller jusqu'à 250 mg. L'échantillon est déposé dans un tube contenant des microbilles de verre ainsi qu'un tampon permettant de dissoudre les acides humiques et de protéger les acides nucléiques contre la dégradation. 60 µl d'une solution (C1) contenant du SDS et d'autres agents permettant la lyse cellulaire sont ensuite ajoutés. Les tubes sont alors placés 10 minutes sur un vortex équipé d'un adaptateur spécifique permettant d'agiter les tubes à très grande vitesse. Ceci va provoquer, du fait de la collision avec les billes de verre, la rupture des membranes cellulaires, et la libération des acides nucléiques. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 1 minute à 10 000 rpm. Le surnageant est recueilli et placé dans un tube de type Eppendorf de 2 mL. 250 µL d'une solution (C2) sont ajoutés. Cette solution contient un agent permettant la précipitation des substances inorganiques et organiques autres que les acides nucléiques (protéines, débris cellulaires, acides humiques). Le tube est ensuite vortexé quelques secondes, placé dans la glace pendant 5 minutes, puis centrifugé 1 minute à 10 000 rpm. 600 µL de surnageant sont recueillis, placés dans un nouveau tube, et 200 µL d'une solution (C3) sont ajoutés. Cette solution contient un second agent précipitant les particules organiques et inorganiques contaminantes. Le tube est à nouveau placé 5 minutes dans la glace puis centrifugé 1 minute à 10 000 rpm. 750 µl de surnageant sont recueillis, auxquels

sont ajoutés 1,2 mL d'une nouvelle solution (C4) hautement concentrée en sel. La solution va ensuite être filtrée à travers une membrane de silice. L'ADN en solution va pouvoir se lier fortement sur cette matrice. Cette rétention de l'ADN ne peut se faire qu'en présence d'une forte salinité, apportée par la solution C4. 675 μ L de solution sont déposés sur la membrane, le tube est centrifugé à 10 000 rpm pendant 1 minute et le filtrat éliminé. Cette étape est répétée jusqu'à ce que la solution contenant l'ADN ait été entièrement déposée sur le filtre. 500 μ L d'une solution (C5) sont ajoutés sur le filtre, puis le tube est centrifugé 30 secondes à 10 000 rpm. Cette solution de lavage est fortement concentrée en éthanol. Elle permet d'éliminer les derniers résidus de substances humiques, débris cellulaires et de sels sans pour autant décrocher l'ADN de la silice. La membrane est à nouveau centrifugée sans ajouter de solution, afin d'éliminer les dernières traces de la solution de lavage. En effet l'éthanol peut interférer avec de nombreuses applications auxquelles pourront être soumis les ADN extraits, et notamment la PCR, pour laquelle il a un effet inhibiteur. La matrice de silice est placée dans un tube de 2 mL. 100 μ L d'eau stérile et dépourvue de DNase sont déposés sur la membrane, puis après une incubation d'une minute à température ambiante, le tube est centrifugé 1 minute à 10 000 rpm. La solution recueillie contient l'ADN génomique total issu de l'échantillon. La quantité d'eau destinée à l'élution de l'ADN peut être ajustée en fonction de la concentration en ADN souhaitée.

La qualité des ADN génomiques ainsi obtenus est contrôlée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1 % (cf. Figure 25).

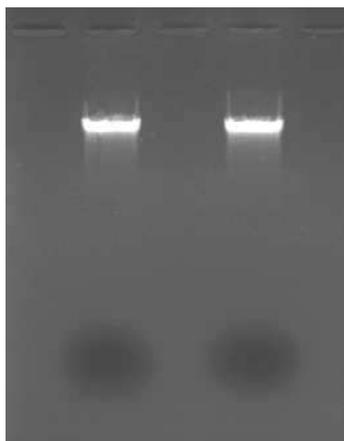


Figure 25 : ADN extraits de boues activées. Migration 30 minutes à 50 volts sur gel d'agarose à 1%, coloration au Bromure d'éthidium et visualisation sous UV.

2.1.2 ARN

2.1.2.1 Stabilisation des échantillons

Au cours de ces travaux, différentes expérimentations ont nécessité l'extraction d'ARN à partir de cultures de microorganismes. Dans certains cas, ces extractions ont été réalisées sur de nombreux prélèvements issus de suivis de bioréacteurs. La procédure d'extraction d'ARN étant relativement longue, les échantillons ont été systématiquement traités à l'aide de RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen). Ce réactif a pour but de stabiliser l'ARN avant la lyse des cellules et l'extraction, et empêcher sa dégradation enzymatique. En effet l'acide ribonucléique est une molécule très instable et fragile. De plus, de nombreux mécanismes enzymatiques conduisent à la dégradation de cette molécule. L'ARN messager (ARNm) est particulièrement sujet à ce type de dégradation. Les ARNm bactériens ont des demi-vies très courtes, de l'ordre de quelques minutes. Ce phénomène rend l'étude du profil de l'expression génique délicat chez les bactéries. Le profil de transcription obtenu par l'extraction d'acides nucléiques couplée à l'utilisation du RNA Protect Bacteria Reagent sera donc dans ce cas beaucoup plus proche de la réalité. De plus, les échantillons ainsi préparés pourront être stockés à -80°C pendant plusieurs semaines avant l'étape d'extraction.

Deux volumes de RNA Protect Bacteria Reagent sont ajoutés à un volume de culture cellulaire. La solution est ensuite agitée par retournement, incubée à température ambiante pendant 10 minutes, puis centrifugée 10 minutes à 10 000 rpm et à température ambiante. Le culot cellulaire peut enfin être stockée à -80°C.

2.1.2.2 Extraction de l'ARN total

Le protocole d'extraction est basé sur l'utilisation combinée du TRIzol[®] Reagent et du système PureLink[™] Micro-to-Midi. Le TRIzol[®] Reagent, destiné à l'isolement de l'ARN total à partir de cellules et de tissus, est une solution monophasique de phénol et de guanidine isothiocyanate. Dans un premier temps, ce produit va permettre, lors de la lyse des cellules et la solubilisation des composés cellulaires, de maintenir l'intégrité de l'ARN. Dans un second temps, après l'ajout de chloroforme suivi d'une centrifugation, l'ARN se retrouve dans la fraction aqueuse de la solution, et pourra ainsi être facilement précipité.

Pour l'extraction des ARN totaux, 1 mL de TRIzol[®] Reagent est utilisé pour une quantité maximale de 1.10^7 cellules. Dans la première phase de l'extraction, qualifiée de phase

d'homogénéisation, le culot cellulaire contenu dans un tube de type Eppendorf de 2 mL, est repris dans 1mL de TRIZOL[®] Reagent, et homogénéisé par des mouvements d'aspiration/refoulement à la pipette. Cette étape va permettre la lyse des cellules et la solubilisation des composants cellulaires. La solution est incubée 5 minutes à température ambiante. 200 µL de chloroforme sont ajoutés. Les tubes sont agités vigoureusement à la main pendant 15 secondes puis laissés à incuber pendant 5 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite centrifugés pendant 15 minutes à 12000g et à 4°C. À la suite de cette centrifugation, la solution se sépare en une phase supérieure aqueuse et incolore, une interphase blanche, et une phase inférieure organique, rouge contenant le phénol et le chloroforme. La phase aqueuse supérieure, contenant l'ARN, est donc prélevée, et un volume d'éthanol à 70% égal à celui prélevé est ajouté. La solution est agitée à l'aide d'un vortex et laissée à incuber 5 minutes à température ambiante. 700 µL de cette solution sont déposés sur une colonne RNA Spin Cartridge insérée dans un tube de type Eppendorf de 2mL, puis centrifugés à 12000g pendant 30 secondes. Cette étape est répétée jusqu'à ce que toute la solution ait été filtrée à travers la colonne. Cette dernière se compose d'une membrane de silice sur laquelle l'ARN est retenu. 700 µL d'un premier tampon de lavage sont déposés sur la colonne, puis centrifugés 30 secondes à 12000g. La colonne de silice est placée dans un nouveau tube de 2 mL et 500 µL d'un deuxième tampon de lavage, fortement concentré en éthanol, sont déposés. Le tube est ensuite centrifugé à 12000g pendant 30 secondes. Cette étape est répétée une seconde fois, puis la colonne vide est centrifugée pendant 1 minute à 12000g afin d'éliminer les dernières traces d'éthanol qui pourraient être présentes sur la membrane. La colonne est enfin transférée dans un tube propre de 1,5 mL. L'ARN lié à la membrane de silice va être décroché. Pour cela 30 µL d'eau sans RNase sont déposés sur la membrane et ainsi laissés à incuber pendant 1 minute à température ambiante. Le tube contenant la colonne est ensuite centrifugé à 12000g pendant 2 minutes. La solution d'éluion obtenue contient l'ARN purifié. Cette dernière est stockée à -80°C.

2.1.2.3 Estimation de la qualité des ARN

Pour une analyse de l'expression génique en RT-QPCR, les ARN extraits doivent être d'excellente qualité. C'est pourquoi lors de ces travaux, nous avons estimé leur qualité avant de poursuivre les analyses en biologie moléculaire.

- *Electrophorèse :*

Dans un premier temps, la qualité des ARN totaux a été estimée par électrophorèse sur gel dénaturant de formaldéhyde. Bien que préservant les ARN de toute dégradation et améliorant la séparation des ARN au cours de l'analyse, cette technique s'est avérée lourde à mettre en œuvre, notamment car elle nécessite l'utilisation de nombreux produits toxiques.

Nous avons donc choisi de réaliser des électrophorèses classiques sur gel d'agarose (cf. Figure 26). Dans ce cas, le gel, le tampon de migration et le tampon de charge sont préparés avec de l'eau traitée à l'aide de DEPC. Cette molécule agit comme un inhibiteur de nucléases, et en particulier des RNases en les modifiant de façon covalente au niveau de leur site actif. Les cuves de migration ainsi que les supports de gels sont nettoyés à l'aide de NaOH 0,2N et de SDS 1%, puis rincés à l'eau ultra pure traitée au DEPC. La migration est réalisée sur des gels à 1% d'agarose, contenant 0,5 µg/mL de BET. 5µL d'échantillon d'ARN sont mélangés à 5 µL de tampon de charge et déposés sur gel. La migration s'effectue à 100 volts pendant 20 minutes. L'acquisition des images de gel est réalisée grâce à une station Gel Doc XR (BIO-RAD). Dans le cas où l'ARN est intact, le gel d'agarose doit présenter deux bandes très nettes correspondant aux ARNr des petites (SSU) et grandes (LSU) sous unités constituant les ribosomes. Un ratio LSU : SSU de 2 :1 indique que l'ARN n'est pas dégradé. En cas de dégradation le ratio diminue, et dans les cas extrêmes, on peut même observer la présence d'un smear.

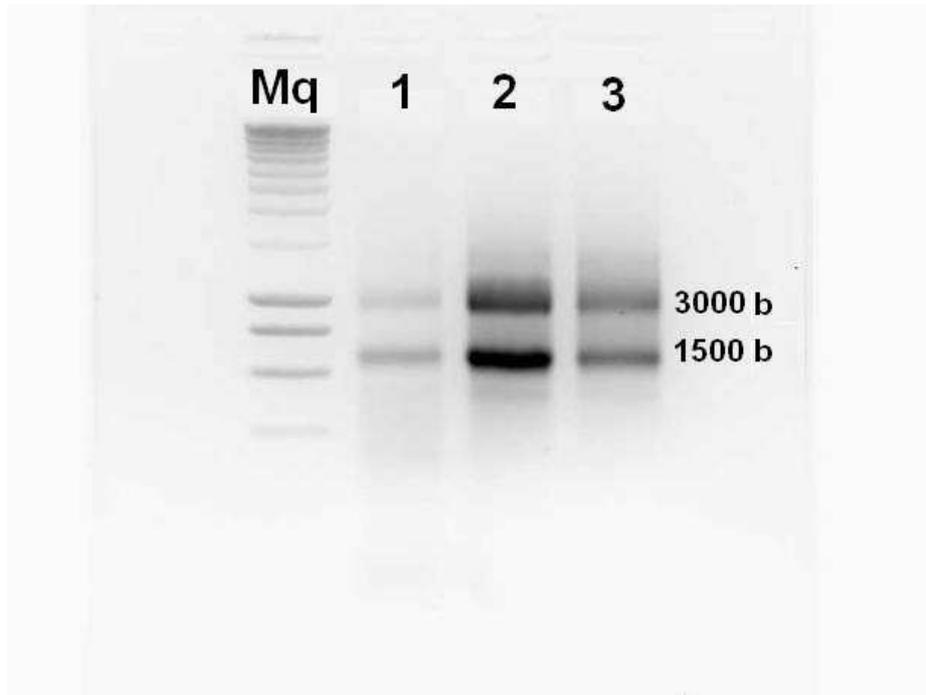


Figure 26 Electrophorèse sur gel d'agarose 1% réalisé avec de l'eau DEPC sur 3 échantillons d'ARN (1, 2 et 3). L'ARN est marqué à l'aide de BET incorporé dans l'agarose et visualisé sur Gel Doc XR (Bio-Rad). Le marqueur de taille (Mq) utilisé est le SmartLadder (Eurogentec).

- *Bioanalyzer Agilent 2100 :*

Une méthode alternative, beaucoup plus simple et rapide a dans un second temps été utilisée pour évaluer la qualité des ARN extraits (cf. Figure 27). Le Bioanalyzer 2100 Agilent est un instrument de microfluidique permettant d'estimer la qualité des ARN. Les intérêts de cette méthode sont multiples. Du fait de sa très grande sensibilité, elle permet de travailler à des concentrations en acides nucléiques très faibles, de l'ordre de 1 ng contre 250 ng pour un gel dénaturant ou d'agarose. Cette technique est également très rapide puisqu'elle permet d'analyser 11 échantillons d'ADN en moins de 30 minutes. Les résultats se présentent soit sous la forme d'un gel virtuel d'agarose, soit sous la forme de pics proportionnels à l'intensité de fluorescence émise par les fragments d'ARN. Le logiciel d'analyse permet d'estimer le ratio LSU : SSU, et donc d'estimer facilement la qualité de l'ARN. Il faut également noter que le bioanalyzer permet d'estimer la concentration de l'échantillon testé.

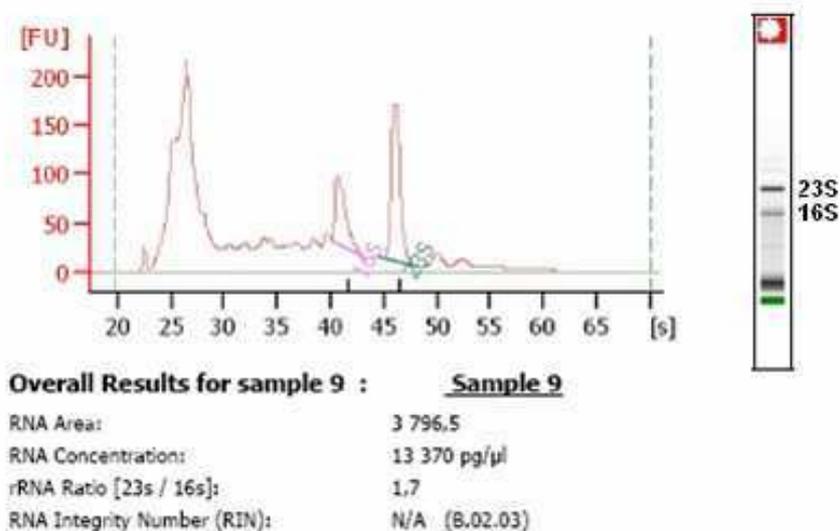


Figure 27: Exemple de résultats obtenus à l'aide du Bioanalyser 2100 Agilent. Détermination du ration 23S :16S et de la concentration en ARN. Présentation des résultats sous forme d'électrophorégramme ou de gel d'agarose virtuel.

Il faut noter que le logiciel ne permet pas de déterminer l'indice d'intégrité (RIN) pour les ARN de procaryotes.

2.1.3 Dosage des acides nucléiques

L'utilisation des acides nucléiques, aussi bien ADN qu'ARN, dans des techniques de biologie moléculaire telles que la PCR quantitative en temps réel, nécessite qu'ils soient quantifiés de façon très précise. Nous avons choisi d'utiliser pour cela le fluorimètre Qubit (Invitrogen) et les kits Quant-iTTM dsDNA et RNA (Invitrogen). Cette méthode permet de doser de façon précise et rapide les échantillons d'ADN et d'ARN. Le dosage est réalisé en mesurant la fluorescence émise par un fluorophore qui se lie aux acides nucléiques et excitée par un laser. Les fluorophores utilisés sont spécifiques de l'ADN double brin ou de l'ARN en fonction du kit utilisé.

Les mesures à l'aide du Qubit sont réalisées dans des tubes de type Eppendorf de 0,5 mL. Une courbe étalon est réalisée à l'aide d'ADN standards fournis dans le kit. 1 à 20 μ L d'échantillons d'acides nucléiques sont mélangés à 199 à 180 μ L d'une solution contenant le marqueur fluorescent dilué au 1/200. Le mélange est incubé 2 minutes à température ambiante, le tube est ensuite inséré dans le Qubit et la concentration en acides nucléiques est mesurée.

2.2 Réaction de Transcription inverse (RT)

Dans le cadre du suivi de l'expression du gène *sthA* ou de la détermination du contenu cellulaire en ARNr au cours du cycle de croissance, nous avons procédé à des réactions de RT-QPCR. Nous avons choisi de séparer cette réaction en deux étapes : une réaction de transcription inverse (RT), suivi d'une PCR quantitative en temps réel (QPCR). La réaction de transcription inverse ou reverse transcription (RT) correspond à la synthèse d'ADN à partir des ARN extraits. L'ADN obtenu est appelé ADNc pour ADN codant. La réaction de RT a été réalisée à partir de l'ARN total, en utilisant des hexanucléotides aléatoires et non des amorces spécifiques d'un gène cible.

La réaction de RT a été effectuée en utilisant le système SuperScriptTM III First-Strand Synthesis pour RT-PCR (Invitrogen). Ce système utilise la reverse transcriptase (RT) SuperScript III, dérivée de la reverse transcriptase M-MLV. Cette enzyme permet d'effectuer la réaction de RT sur un ARN total sans effet d'inhibition dû aux ARNr ou ARNt et peut synthétiser des ADNc à partir d'ARN ayant une taille comprise entre 100 bases (b) et 12 kilobases (kb).

La réaction de RT est réalisée dans un tube de 0,2 mL. Une quantité d'ARN comprise entre 1 pg et 5 µg est mise en présence d'hexanucléotides (50 ng/µL) et d'un mélange des 4 dNTP (10 mM), le volume est complété à 10 µL avec de l'eau exempt de RNase. Cette solution est incubée 5 minutes à 65°C afin de linéariser l'ARN et de faciliter l'accès des amorces sur leur séquence cible. Le tube est ensuite plongé dans la glace pendant au moins 1 minute. Une solution comprenant 2 µL d'un tampon spécifique de l'enzyme, du MgCl₂ (25 mM), du DTT (0,1 M), 40 unités de RNase OUT (inhibiteur de RNase fourni dans le kit) et 200 unités de la reverse transcriptase SuperScriptTM III est préparée. 10 µL de cette solution sont ajoutés à celle contenant l'ARN. Le mélange est ensuite incubé 10 minutes à 25°C, puis 50 minutes à 50°C. Cette étape correspond à la synthèse de l'ADNc par l'enzyme reverse transcriptase. Le mélange est ensuite incubé 5 minutes à 85°C afin d'inactiver l'enzyme. Le tube est enfin plongé dans la glace quelques minutes. L'ADNc ainsi obtenu peut ensuite être traité à la RNase afin d'éliminer toute trace d'ARN, puis stocké à -20°C avant la réaction de PCR.

2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction) et QPCR (PCR quantitative en temps réel)

2.3.1 Principe

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR a, depuis son apparition, bouleversé la biologie moléculaire dont elle est ainsi devenue depuis une vingtaine d'années une des techniques de base en s'implantant dans la plupart des laboratoires. Elle a été décrite pour la première fois par Mullis (1986), et a lui a valu de recevoir le prix Nobel de chimie en 1993.

Cette technique utilise *in vitro* la capacité de réplication de l'ADN que possède l'enzyme ADN polymérase, afin de produire des milliards de copies d'un fragment d'ADN cible afin de mettre en évidence sa présence ou son absence dans l'échantillon d'ADN, et ce même s'il n'est présent qu'en infime quantité. L'ADN polymérase a pour rôle de dupliquer le matériel génétique de la cellule lors de la division cellulaire. *In vivo*, cette enzyme est associée à de nombreuses autres enzymes qui permettent notamment d'ouvrir le double brin d'ADN et de le stabiliser. *In vitro*, il serait délicat de recréer cette coopération moléculaire, et la séparation des deux brins de la molécule d'ADN est provoquée par chauffage à une température proche de 95°C. La nécessité de travailler à de telles températures a conduit à sélectionner un type particulier d'ADN polymérase. La plus connue a été purifiée à partir d'une espèce bactérienne thermophile nommée *Thermus aquaticus* et dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C. Cette enzyme, souvent désignée sous le terme de Taq polymérase, peut donc supporter des températures identiques à celles utilisées pour dénaturer la structure secondaire de l'ADN sans que cela n'altère pour autant son activité. D'autres ADN polymérases capables de travailler à haute température ont été découvertes. De nos jours, les enzymes utilisées sont dites recombinantes et ont largement été modifiées afin de les rendre plus efficaces et d'augmenter leur fidélité, c'est-à-dire diminuer les erreurs commises lors de la synthèse du brin d'ADN complémentaire.

La PCR repose sur une succession de 30 à 40 cycles qui se divisent chacun en trois phases (cf. Figure 28) :

- ✓ **La dénaturation** : cette étape s'effectue à 95°C et consiste à ouvrir la double hélice d'ADN et à n'obtenir que des simples brins.
- ✓ **L'hybridation** : cette phase permet l'hybridation des amorces d'ADN. Ce sont de courtes séquences d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides) capables de

s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier. Et comme leur nom l'indique elles vont permettre à l'ADN polymérase d'amorcer sa réaction de synthèse de l'ADN. Pour permettre cette hybridation, la température est ramenée à une valeur comprise entre 55 et 65°C, et dépend de la valeur de la température de fusion de l'amorce. La température d'hybridation choisie y est généralement inférieure d'environ 5°C.

- ✓ **L'élongation** : c'est durant cette phase que l'ADN polymérase va procéder à la synthèse des nouveaux brins d'ADN. L'enzyme va se fixer à l'extrémité 3' de l'amorce et créer le brin complémentaire au simple brin d'ADN. La température optimale de fonctionnement d'une Taq polymérase est généralement de 72°C. La durée de cette étape dépend de la longueur du brin d'ADN à synthétiser. On considère qu'il faut 1 minute pour synthétiser un brin d'ADN de 1000 nucléotides.

L'amplification du produit initial par la réaction de PCR est exponentielle, ainsi pour une réaction comprenant 35 cycles, le nombre initial de copies de fragments d'ADN cibles est multiplié par 2^{35} , soit par plus de 34 milliards !

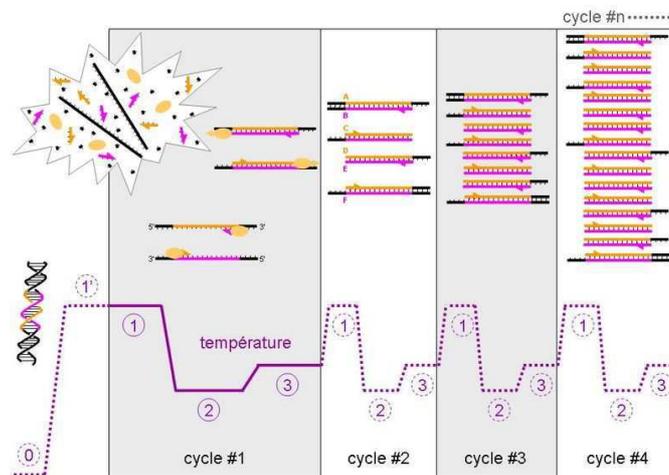


Figure 28 : Principe général de la PCR. Les étapes notées 0 et 1' correspondent respectivement au point de départ de la réaction de PCR, soit à la température ambiante, et à une étape d'activation de la Taq polymérase qui se fait pendant quelques minutes à 95°C. Lors des cycles suivants, l'étape 1 correspond à la phase de dénaturation de l'ADN double brin (à 95°C), l'étape 2 correspond à la phase d'hybridation des amorces (entre 55 et 65°C) et enfin l'étape 3 correspond à la synthèse du brin complémentaire d'ADN (à 72°C). Le cycle suivant reprend au niveau de l'étape de dénaturation afin de permettre la séparation du brin d'ADN nouvellement formé du brin matrice. La croissance est exponentielle et à la fin de la réaction le fragment d'intérêt est très largement majoritaire dans le mélange réactionnel.

L'amplification n'est en fait pas exponentielle tout au long de la réaction. Une limitation dans la quantité d'un ou plusieurs réactifs, ainsi qu'une perte d'activité de l'ADN polymérase font

que la quantité finale du produit de PCR n'est pas proportionnelle à la quantité initiale. L'amplification est donc dans un premier temps exponentielle, puis elle entre dans une phase linéaire où le taux d'amplification devient extrêmement variable, et s'en suit enfin une phase de plateau, où le taux d'amplification tend à devenir nul.

La PCR quantitative en temps réel permet de déterminer avec précision la quantité d'ADN cible, dans l'échantillon. Cette technique est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Il existe deux principaux types de reporters fluorescents : les agents s'intercalant dans l'ADN double brin, de type SYBR Green, et les sondes fluorescentes, de type Taqman, Molecular Beacon ou Scorpion primer. Dans le cadre des travaux ici présentés, nous avons utilisé la chimie SYBR Green et nous détaillerons donc uniquement son principe de fonctionnement.

Le SYBR Green est un agent intercalant spécifique de l'ADN double brin qui se fixe au niveau du sillon mineur. Lors de la réaction de PCR, la molécule libre émet très peu de fluorescence. Lors de la synthèse de nouvelles molécules d'ADN double brin, la quantité de molécules fluorescentes qui se lient dans le sillon mineur augmente, ce qui provoque une augmentation du signal fluorescent (cf. Figure 29). Lors de l'étape de dénaturation, l'émission de fluorescence est quasiment réduite à zéro. L'intensité du signal fluorescent est donc mesurée à chaque cycle à la fin de chaque étape d'élongation. La lecture se fait à travers le bouchon des tubes de PCR spécifiquement prévus pour cette application.

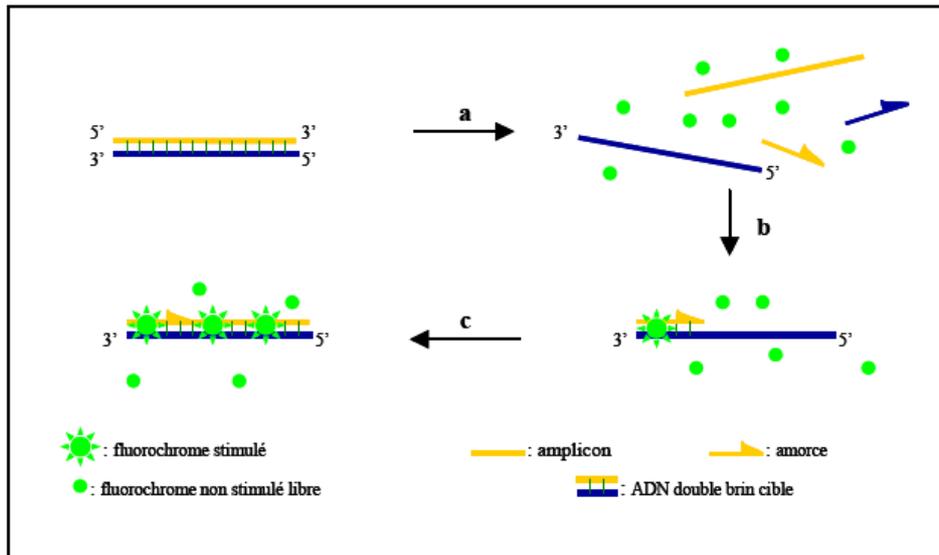


Figure 29 : Principe de la quantification par un agent intercalant de l'ADN double brin, le SYBR Green. Durant la phase de dénaturation, les molécules de SYBR Green libres n'émettent quasiment pas de fluorescence. Durant la phase d'élongation du brin d'ADN complémentaire, de plus en plus de molécules se fixent dans le sillon mineur du double brin naissant. L'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel à la fin de chaque phase d'élongation.

En ce qui concerne la chimie Taqman[®], la fluorescence est émise lorsque la sonde, qui s'hybride sur une partie de l'ADN située entre les deux amorces, est hydrolysée par l'activité 5'-exonucléasique de l'ADN polymérase. Dans ce cas, la fluorescence reste constante au cours d'un cycle.

L'intersection entre les courbes de fluorescence et le seuil de fluorescence (cf. Figure 30), niveau au-delà duquel la fluorescence émise devient significativement différente du bruit de fond, détermine un nombre de cycles qui correspond au cycle seuil ou Ct (Cycle Threshold) (Gibson *et al.*, 1996). Ce dernier, ainsi que la ligne de base du bruit de fond, sont automatiquement déterminés par le logiciel associé à l'appareil de QPCR, dans notre cas le MX4000 version 4.20. Le seuil de fluorescence peut également être ajusté de façon manuelle.

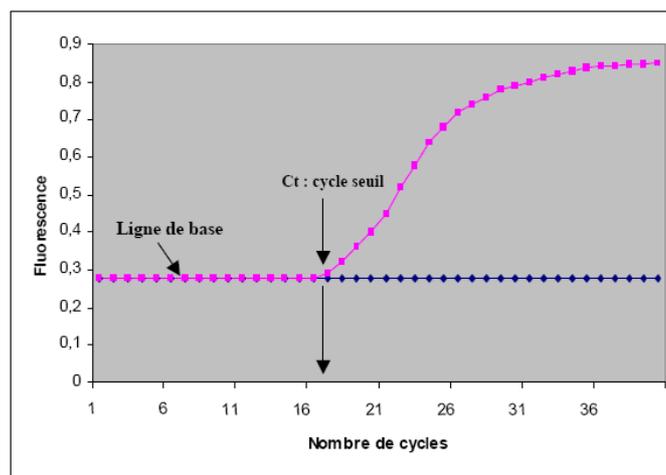


Figure 30 : Représentation graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de produits d'amplification. Le cycle seuil (Rhodes *et al.* 2007) représente le nombre de cycles requis pour que le signal de fluorescence soit significativement plus élevé que le bruit de fond.

Une courbe étalon est réalisée à l'aide d'une série de dilutions d'un échantillon d'ADN. La détermination du cycle seuil pour chacune des dilutions va permettre au logiciel de calculer une droite standard ou étalon. Pour que l'efficacité de la réaction de PCR soit de 100% quelque soit la concentration en ADN dans la réaction, cette droite doit avoir une pente d'une valeur de -3,32. Le logiciel détermine le nombre de copies d'ADN cible présentes dans l'échantillon à analyser en se basant sur la droite étalon et le Ct.

Le principal intérêt de l'utilisation du SYBR Green est d'ordre économique. Dans ce cas, la spécificité n'est due qu'aux amorces utilisées pour la PCR et ne nécessite donc aucune sonde reporter, ce qui est le composant le plus onéreux lorsqu'on utilise notamment la chimie Taqman[®]. Le principal inconvénient vient du fait que les amorces utilisées doivent être extrêmement spécifiques de la séquence d'intérêt, le SYBR Green s'intercalant dans tout les ADN double brin. Le multiplexage, c'est-à-dire le suivi de plusieurs produits d'amplification simultanément, est également impossible par cette technique.

2.3.2 Protocole de PCR

Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant la Thermo-Start[®] DNA polymerase (ABgene/Thermo scientific). Cette enzyme nécessite, préalablement à la réaction de PCR proprement dite, d'être activée pendant 15 minutes à 95°C. Cette activation à haute température empêche les hybridations non-spécifiques à des températures inférieures au T_m des amorces lors de la montée en température initiale.

Le thermocycleur utilisé est un Mastercycler[®]ep (Eppendorf). Le tampon de réaction spécifique à l'ADN polymérase, ainsi que le MgCl₂ sont fournis avec l'enzyme. Les dNTP ont également été fournis par la société ABgene. L'eau ultrapure provient d'un système de filtration Milli-Q[®]Ultrapure Water Purification (Millipore). Elle est en plus autoclavée à 120°C pendant 15 minutes et conservée à 4°C.

Les réactions de PCR sont réalisées en microtube de 200 µL. Dans chaque tube sont mélangés : 2,5 µL du tampon de l'enzyme, 1 µL d'un mélange des 4 dNTPs à 25 mM, 1,5 µL de MgCl₂ à 25 mM, 1,5 µL de chacune des amorces à 10 µM, 0,1 µL de Thermo-Start[®] DNA polymerase, de 1 à 5 µL de l'échantillon d'ADN correspondant à une quantité de 1 et 250 ng. Le volume est complété à 25 µL avec de l'eau Milli-Q.

Les profils d'amplifications sont variables suivant les couples d'amorces utilisés et seront décrits ultérieurement. Pour chaque PCR, une réaction contrôle (NTC) est réalisée pour chaque couple d'amorces utilisé. Dans ces NTC (No Template Control) l'ADN est remplacé par de l'eau Milli-Q. Ces contrôles ont pour but de détecter une éventuelle contamination d'un des réactifs par de l'ADN.

2.3.3 Protocole de QPCR

Les réactions de QPCR ont été réalisées sur le thermocycleur MX 4000 (Stratagene) en utilisant le mélange ABsolute[™] QPCR SYBR[®] Green (ABgene). Ce mélange contient une enzyme Thermo-Start[®] DNA polymerase, le tampon de l'enzyme, le MgCl₂, les dNTP, et le SYBR Green. La réaction de PCR est réalisée sur une quantité d'ADN inférieure à 500 ng. Le volume réactionnel final est complété par 12,5 µL de mélange ABsolute[™] QPCR SYBR[®] Green, 1 µL de ROX à 100 nM, 1 µL de chacune des amorces à une concentration de 10 µM et un volume d'eau variable en fonction du volume de l'échantillon d'ADN. Le ROX est un marqueur de référence dont l'intensité de signal doit rester stable au cours de la réaction de PCR. Il permet de détecter un problème de lecture de la fluorescence par l'appareil de QPCR, et de normaliser le niveau de fluorescence d'un tube à l'autre.

Les profils d'amplification sont variables suivant les couples d'amorces considérés. Ils comprennent dans toutes les cas une étape d'activation de l'ADN polymérase de 15 minutes à 95°C, suivi de 40 cycles composés des 3 étapes suivantes : 95°C pendant 30 secondes, de 57 à 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes, suivi enfin d'un programme

permettant d'obtenir une courbe de dissociation ou de fusion (cf. Figure 31). Il se compose d'une étape à 95°C pendant 30 secondes, d'une étape à 60°C pendant 30 secondes, puis de 80 cycles de 10 secondes au cours desquels la température augmente pour chacun d'eux de 0,5°C. La température passe donc de 60 à 100°C et la fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle. Cette étape permet de vérifier que l'on n'obtient bien au final qu'un produit d'amplification, et qu'il n'y a pas formation de dimères d'amorces.

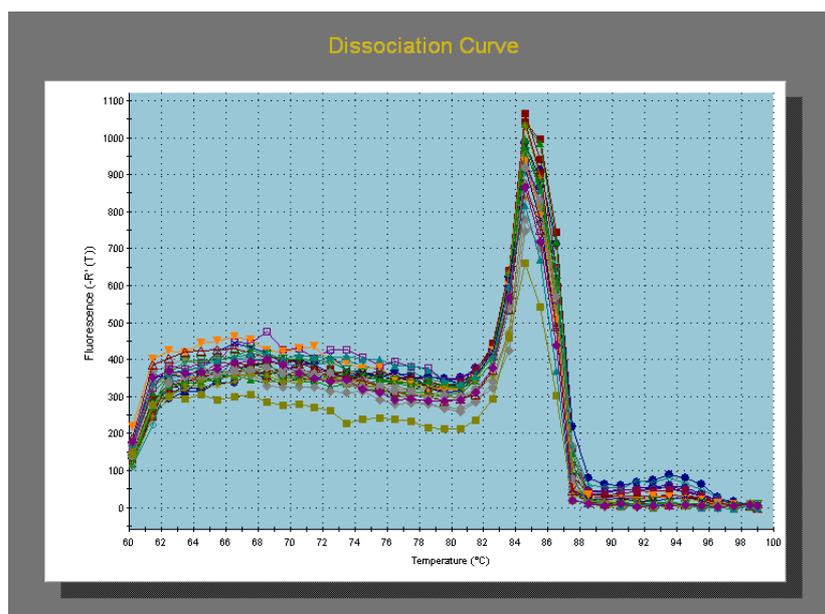


Figure 31 : Exemple de courbe de fusion ou de dissociation obtenue après une réaction de QPCR. Dans ce cas un seul pic de fluorescence est obtenu pour un produit d'amplification ayant une température de fusion proche de 84°C. Cette courbe permet donc de vérifier que la réaction de PCR n'aboutit à la formation que d'un produit de PCR. Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de confirmer que la taille du produit est celle attendue, confirmant ainsi la spécificité des amorces et de la réaction de PCR.

Là encore des réactions contrôles sont réalisées pour chaque couple d'amorces, pour mettre en évidence une éventuelle contamination d'un des réactifs par de l'ADN génomique, ou bien la formation de dimère d'amorces.

2.3.4 Quantification relative, méthode du $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Dans le cadre du suivi de l'expression du gène *sthA*, nous avons choisi de réaliser une quantification relative basée sur la méthode de calcul dite du $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Cette dernière implique que l'expression du gène d'intérêt soit normalisée par rapport à celle d'un gène dit de référence et qui s'exprime de façon relativement constante.

$$\Delta C_T = C_T \text{ gène cible} - C_T \text{ gène de référence}$$

Le gène de référence ici choisi est celui de l'ARNr 16S. Nous pourrions voir ultérieurement que l'expression de ce dernier varie au cours du cycle de croissance cellulaire, cependant de précédentes études ont montrés qu'il restait le gène de référence dont le niveau d'expression était le plus stable au cours du temps et quelques soient les conditions environnementales (Tasara & Stephan, 2007). De plus, si sa concentration cellulaire varie, sa proportion dans l'ARN total reste stable, à savoir 80%. Il apparaît donc comme étant exprimé à un niveau constant, en regard des ARN messagers (ARNm). Cette expression relative du gène pour chacun des échantillons est elle-même comparée à l'expression de ce même gène dans un échantillon dit témoin.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ échantillon} - \Delta C_T \text{ témoin}$$

On peut ensuite obtenir un niveau d'expression relatif (RQ) du gène *sthA* pour nos différents échantillons grâce à la formule suivante :

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Nous avons donc, grâce à cette méthode, pu comparer les niveaux d'expression du gène *sthA* pour nos souches sous formes filamenteuse et unicellulaire.

Dans notre cas, le témoin est représenté par les échantillons d'ADNc provenant des ARN de *Sphaerotilus natans* sous forme unicellulaire. L'expression du gène *sthA* pour cette population sera donc de 1. On comparera l'expression de *sthA* de la forme filamenteuse, par rapport à celle de la forme dispersée.

2.3.5 Amorces

2.3.5.1 Création des amorces

Les amorces utilisées pour la quantification de *Sphaerotilus natans* en boues activées ainsi que pour le suivi de l'expression du gène *sthA* ont été créées en utilisant le logiciel Primer3. Ce logiciel est disponible sur Internet à l'adresse suivante : http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi. Il permet la création d'amorces, mais également de sondes, pour la PCR ou QPCR.

L'utilisateur entre la séquence nucléotidique du gène pour lequel les amorces doivent être créées. Primer3 choisit ensuite automatiquement des couples d'amorces en fonction des principaux critères que sont :

- ✓ la température de fusion des oligonucléotides, leur taille, leur pourcentage en GC et la possibilité de former des dimères d'amorces
- ✓ la taille du produit de PCR
- ✓ les contraintes positionnelles dans la séquence source, c'est-à-dire les régions à inclure ou à exclure du produit de PCR

D'autres contraintes peuvent également être fixées par l'utilisateur.

Les amorces ainsi créées sont ensuite confrontées aux bases de données afin de vérifier leur spécificité en utilisant le programme BLAST2, (Basic Local Alignment Search Tool) à l'adresse suivante : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Cet algorithme permet de déterminer la similitude entre une séquence nucléotidique donnée et les séquences présentes dans les banques de données (NCBI).

2.3.5.2 Amorces utilisées

Les différentes amorces utilisées en PCR sont listées dans le Tableau 6.

Dénomination	Cible	Séquence (5'-3')	Long.	Tm (°C)	Référence	
16S sna 1 FP	ADNr 16S <i>S. natans</i>	AACGAAGAACGCGTGAAGTT	20	59,9°C	Cette étude	
16S sna 1 RP		ATGCAGCACCTGTGTCTGA	20	60,5	Cette étude	
16S sna 2 FP		CCGCAAGTGAAACTCAAAGGAATTG	25	59,6	Cette étude	
16S sna 2 RP		GCACCTGTGTCTGATTCTCTTTTCG	25	60,4	Cette étude	
357F	ADNr 16S de toutes les bactéries	CCTACGGGAGGCAGCAG	17	63,5	(Schuurman <i>et al.</i> , 2004)	
515R		TACCGCGGCTGCTGGCAC	18	63,5	(Schuurman <i>et al.</i> , 2004)	
F-tot		GCAGGCCTAACACATGCAAGTC	22	62,1	(Marchesi <i>et al.</i> , 1998)	
R-tot		CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	63,5	(Amann <i>et al.</i> , 1995; Amann <i>et al.</i> , 2001)	
YEASTF		ADNr 23S <i>S. cerevisiae</i>	GAGTCGAGTTGTTGGGAATGC	22	60,3	(Hiero <i>et al.</i> , 2006)
YEASTR	TCTCTTTCCAAAGTCTTTTCATCTTT		27	57,4	(Hiero <i>et al.</i> , 2006)	
UP1	Gène <i>sthA</i>	ATGAGCGATACCCACTTCGGCTTC	24	60,2	(Suzuki <i>et al.</i> , 2002)	
UP2		TGTGGCGTGCACGACATGTTTCGAT	24	61,6	(Suzuki <i>et al.</i> , 2002)	
sthA FP		CGTGCTCTATTCCTTCGTC	20	60,1	Cette étude	
sthA RP		GGCGTAACCGTCATAGCTGA	20	61,1	Cette étude	
sthAFOR		ATCGGCACCGCAATCCGGT	20	55,4	(Suzuki <i>et al.</i> , 2002)	
sthAREV		ATGCGGTCTTTCGGATGAA	20	53,8	(Suzuki <i>et al.</i> , 2002)	
sthA L1 FP		ACACACGCTGATTTGTACGC	20	58,5	Cette étude	
sthA L1 RP		TGTCCTCTGGTCTGGAGCTT	20	59,4	Cette étude	
sthA L2 FP		GGAGTCAGGATCGAAAATCA	20	58,3	Cette étude	
sthA L2 RP		GGTCTGGAGCTTCTGTCGTC	20	61,4	Cette étude	
sthA L 24 FP		CATCTGTTGACGCAGTTGGT	20	57,3	Cette étude	
sthA L 75 FP		ACAATCGTGCTCCAGCTCC	20	59,4	Cette étude	
sthA L 832 FP		AGAAGCTGGTCGATCTGGTG	20	59,4	Cette étude	
sthA L 915 FP		ATGAACGATCTGCTCGAGTG	20	55,3	Cette étude	
sthA L 882 RP		CCACGATGATCTCGTTGATG	20	57,3	Cette étude	
sthA L 986 RP		GGTGCCTCGTAGAAGTAGG	20	61,4	Cette étude	
sthA L 1723 RP		GGTCTGGAGCTTCTGTCGTC	20	61,4	Cette étude	
sthA L 1781 RP		AAATGAACACGCCTTGAAGC	20	55,3	Cette étude	
M13F		Plasmide pCR4-TOPO	GTAAAACGACGGCCA	16	51,7	(Invitrogen)
M13R			CAGGAAACAGCTATGAC	17	50,4	(Invitrogen)

Tableau 6 : Amorces de PCR utilisées lors des différents travaux.

Toutes les amorces utilisées lors de ces travaux ont été synthétisées par la société MWG (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Allemagne). Les valeurs de Tm sont celles fournies par MWG et non celles fournies par le logiciel Primer3.

2.4 FISH

Le protocole utilisé dans cette étude est basé sur les travaux publiés par Amann *et al.* (1990) et Manz *et al.* (1992).

2.4.1 Protocoles

Lors de nos travaux nous avons dû procéder à des marquages FISH sur des échantillons déposés sur lame, pour une observation microscopique classique. Nous avons également développé un protocole de marquage FISH en milieu liquide, pour une analyse en cytométrie en flux.

2.4.1.1 FISH sur lame

✓ Fixation

Les échantillons (boues diluées ou cultures pures) sont dans un premier temps fixés à l'éthanol absolu. Ce dernier est ajouté volume à volume et le tout est mélangé par retournement. Des lames à 10 puits à revêtement en Téflon sont utilisées pour ce marquage. 10 à 20 μL , en fonction de la concentration de l'échantillon, sont déposés sur chaque puits. La lame est ensuite séchée dans un four à 46°C. Les échantillons sont déshydratés par immersions successives de 3 minutes dans des solutions à concentration croissante en éthanol (50, 80 et 96%). La lame est une nouvelle fois séchée à 46°C.

✓ Hybridation

9 μL de tampon d'hybridation auxquels est ajouté 1 μL de la sonde diluée à 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ sont déposés dans chaque puits. Le tampon contient du formamide, dont la concentration (en pourcentage) dépend de la stringence définie pour chaque sonde. Les informations portant sur les différentes sondes, et en particulier le pourcentage de formamide à utiliser dans le tampon d'hybridation sont disponibles sur la base de donnée ProbeBase (<http://www.microbial-ecology.net/probebase/>), et regroupant toutes les sondes FISH référencées en écologie microbienne.

La composition du tampon d'hybridation est la suivante, pour 2 mL :

- 360 μ L de NaCl 5M
- 40 μ L de Tris-HCl 1M à pH 8,0
- X μ L de formamide
- Eau ultrapure qsp 2 mL
- 4 μ L de SDS 10%

Les quantités de formamide et d'eau sont fonction de la concentration en formamide souhaitée (cf. Tableau 7).

Pourcentage de formamide	μ L de formamide (X)	μ L d'eau ultrapure (Y)
0	0	1600
5	100	1500
10	200	1400
15	300	1300
20	400	1200
25	500	1100
30	600	1000
35	700	900
40	800	800
45	900	700
50	1000	600
60	1200	400
65	1300	300
70	1400	200

Tableau 7 : Quantités de formamide et d'eau à utiliser pour le tampon d'hybridation en fonction du pourcentage en formamide nécessaire.

Une fois les puits recouverts par le tampon d'hybridation et la solution de sonde, la lame est placée dans un tube à hybridation et le tampon non utilisé est déposé sur une lame alvéolée qui sera ensuite placée sur le fond du tube, fermé hermétiquement à l'aide d'un bouchon à vis. Ceci permet de maintenir une atmosphère saturée en solution de formamide au cours de l'étape d'hybridation. Le tube est placé dans un four à hybridation pendant 1h30 à 46°C.

✓ Lavage

Un volume de 50 mL de tampon de lavage est préparé à l'avance et incubé à 48°C au bain-marie pendant la phase d'hybridation. La stringence de ce tampon, est fonction de la concentration en formamide utilisée dans le tampon d'hybridation (cf. Tableau 8).

La composition de ce tampon de lavage est la suivante, pour 50 mL :

- 1 mL de Tris-HCl 1 M à pH 8,0
- 500 μ L d'EDTA 0,5M
- 50 μ L de SDS 10%
- Z μ L de NaCl 5M
- eau ultrapure qsp 50 mL

Formamide dans le tampon d'hybridation (%)	μ L de NaCl 5M dans le tampon de lavage (Z)
0	9000
5	6300
10	4500
15	3180
20	2150
25	1490
30	1020
35	700
40	460
45	300
50	180
55	100
60	40
70	Pas de NaCl mais 350 μ L d'EDTA 0,5 M

Tableau 8 : Quantités de NaCl 5M entrant dans la composition du tampon de lavage en fonction de la concentration en formamide du tampon d'hybridation

La lame est rincée avec 2 mL de tampon de lavage. Elle est ensuite immergée dans le tube de 50 mL contenant le tampon de lavage et incubée pendant 10 minutes à 48°C. Puis la lame est brièvement rincée à l'eau distillée et mise à sécher dans un four à 46°C.

✓ Coloration DAPI

Il est possible, parallèlement au marquage FISH de réaliser une coloration au 4'-6'-diamino-2-phenylindole (DAPI). Cette molécule a pour caractéristique de se fixer à l'ADN, et préférentiellement à l'ADN double-brin dans le sillon mineur au niveau des clusters AT. Elle permet ainsi de visualiser tous les microorganismes présents dans l'échantillon (eucaryotes et procaryotes), indépendamment de leur état physiologique. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du DAPI lié à l'ADN sont respectivement de 358 et 461 nm. Une fois marquées, les cellules observées en microscopie émettent une fluorescence de couleur bleue.

Une fois le marquage FISH terminé, 10 μL d'une solution de DAPI à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sont déposés sur chacun des puits de la lame. Elle est ensuite incubée 5 minutes à température ambiante et à l'obscurité, la molécule de DAPI est en effet sensible à la lumière. La lame est ensuite rincée à l'eau distillée et séchée au four à 46°C .

✓ **Préparation de la lame pour l'observation**

Une goutte de Cityfluor (Interchim) est déposée sur chacun des puits. Ce réactif composé de PBS, de Glycérol (vol/vol) et d'un antifading, limite la diminution de la fluorescence lors de l'exposition aux lasers. Une lamelle est ensuite placée sur la lame en appliquant une certaine pression afin de chasser l'excès de Cityfluor. La lame est ainsi prête à l'observation.

✓ **Observations microscopiques**

Les lames sont, dans la mesure du possible, observées le jour même du marquage. Elles sont ensuite conservées à 4°C , et emballées dans du papier aluminium afin de les préserver de la lumière, en vue d'une éventuelle observation ultérieure.

Les observations sont réalisées sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 200M équipé d'une lampe à vapeur de mercure à arc court HBO de 100W pour les observations en épifluorescence. Le microscope est équipé d'une tête confocale à balayage laser, et d'un banc comprenant un laser argon et 2 HeNe, permettant une excitation aux longueurs d'ondes 488, 543 et 633 nm. L'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel Start LSM Image Browser. Les observations sont effectuées à des grossissements de 400 et 630

2.4.1.2 FISH en milieu liquide

Un marquage FISH en milieu liquide est destiné à une analyse en cytométrie en flux. Le protocole est inspiré du protocole de marquage sur lame.

- ✓ **Fixation** : Un volume de culture cellulaire est prélevé et fixé avec de l'éthanol absolu volume à volume.
- ✓ **Hybridation** : Le marquage est ensuite réalisé sur 1 mL de cette culture fixée qui est dans un premier temps centrifugée à $14\ 000g$ pendant 5 minutes. Le culot est ensuite repris dans 1 mL de tampon d'hybridation dont la composition est identique à celle décrite précédemment, et centrifugé à $14\ 000g$ pendant 5 minutes. Cette étape est

répétée une nouvelle fois, mais en éliminant seulement 900 μL de surnageant. Le culot est repris dans les 100 μL restants et 10 μL de sonde à 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ sont ajoutés. Le tout est alors incubé 16 heures à 35°C.

- ✓ **Lavage** : après l'étape d'hybridation, la solution est centrifugée 5 minutes à 14 000g. Le culot est ensuite repris dans 400 μL de tampon de lavage, dont la composition est identique à celle décrite dans le paragraphe précédent, et incubé 10 minutes à 37°C. La solution est enfin centrifugée à 14 000g pendant 5 minutes et le culot est repris dans 1 mL de PBS.

Le produit ainsi marqué est alors prêt à être analysé par cytométrie en flux.

2.4.2 Sondes utilisées

Les différentes sondes ont été utilisées au cours de ces travaux (cf. Tableau 9). La sonde SNA n'a été utilisée que pour des marquages FISH sur lame, alors que la sonde PF2 n'a été utilisée que lors de marquages en milieu liquide. La sonde EUB338 a été utilisée dans les 2 situations.

Dénomination	Séquence 5'-3'	Groupe ciblé	Formamide (%)	Référence
EUB338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Bactéries	0-50	(Amann <i>et al.</i> , 1990)
SNA	AT CCC CCT CTA CCG TAC	<i>S. natans</i>	45	(Wagner <i>et al.</i> , 1994)
PF2	CTC TGG CTT CAC CCT ATT C	Toutes les levures	30	(Kempf <i>et al.</i> , 2000)

Tableau 9 : Sondes utilisées en FISH.

Les sondes EUB338 et PF2 sont associées au fluorochrome FITC, d'une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et d'une longueur d'onde d'émission de 525 nm. La sonde SNA est associée au fluorochrome Cy3, d'une longueur d'onde d'excitation de 554 nm et d'une longueur d'onde d'émission de 666 nm.

2.5 Clonage

Le clonage est utilisé dans l'optique du séquençage du gène *sthA* chez les différentes souches de *Sphaerotilus natans* à notre disposition. Différents jeux d'amorces (cf. Tableau 6, page 110) ont été créés pour amplifier quasiment la totalité du gène. Le clonage a été réalisé en utilisant le système TOPO TA Cloning[®] kit pour séquençage (Invitrogen-Molecular Probes).

Tous les réactifs utilisés sont fournis dans le kit à l'exception des amorces de PCR pour le gène *sthA*.

L'amplification du gène *sthA* a été réalisée en utilisant 3 couples d'amorces :

- *sthA* L 24 FP/*sthA* RP
- *sthA* FP/*sthA* L 986 RP
- *sthA* L 832 FP/*sthA* L 1781 RP

La réaction de PCR suit le protocole décrit précédemment. Les produits ainsi obtenus sont ensuite insérés dans le plasmide pCR[®]4-TOPO[®]. Pour cela, 0,5 à 4 µL de produits de PCR sont mélangés dans un microtube de 200 µL à 1 µL d'une solution saline et 1 µL de vecteur pCR[®]4-TOPO[®]. Le volume final est ajusté à 6 µL avec de l'eau ultrapure. La solution de clonage ainsi obtenue est mélangée délicatement, incubée 10 minutes à température ambiante puis placée dans la glace.

2 µL de la solution de clonage sont ajoutés et délicatement mélangés dans un tube contenant une suspension de bactéries *E. coli* TOP10 compétentes. Après une incubation de 10 minutes dans la glace, la suspension cellulaire est placée 30 secondes dans un bain-marie à 42°C. Ceci dans le but de créer un choc thermique qui perméabilisera les cellules et permettra l'entrée du plasmide pCR[®]4-TOPO[®]. La suspension est immédiatement placée dans la glace. 250 µL de milieu S.O.C. sont ajoutés à la suspension bactérienne, et les tubes sont placés dans une étuve à 37°C. Après 1 heure d'incubation, 35 à 50 µL de la suspension cellulaire sont étalés sur des boîtes de gélose LB contenant 50 µg.mL⁻¹ d'ampicilline. Les boîtes sont ensuite placées à 37°C pendant 16 à 24 heures. L'ampicilline sert à sélectionner les bactéries ayant incorporées le plasmide, en effet ce dernier contient un gène de résistance pour cet antibiotique. De plus, l'utilisation du vecteur pCR[®]4-TOPO[®] ne nécessite pas l'utilisation d'un moyen de sélection des clones positifs, comme par exemple l'emploi de X-gal. Le fragment à cloner va venir s'insérer dans le plasmide au niveau d'un gène létal pour la bactérie, le gène *ccdB*, qui code pour une protéine toxique qui va inhiber l'interaction gyrase-ADN, empêchant ainsi l'action de l'ADN polymérase et aboutissant au final à une dénaturation de l'ADN double brin. Ainsi, seules les bactéries ayant incorporées un plasmide porteur d'un insert pourront se développer sur les boîtes.

Trois colonies sont prélevées par boîte. Chacune est introduite dans un tube de culture stérile contenant 2 mL de bouillon LB et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'ampicilline, puis placée à 37°C pour une nuit. L'ADN plasmidique est ensuite extrait à l'aide du système de purification Wizard® *Plus SV* minipreps (Promega). Des réactions de PCR sont ensuite réalisées à l'aide des amorces M13F et M13R, puis les produits sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% afin de vérifier si les plasmides contiennent l'insert d'intérêt.

Les plasmides ayant effectivement incorporés l'insert sont envoyés pour séquençage à la société MWG (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Allemagne).

La position des différentes amorces de PCR utilisées sur la séquence du gène *sthA*, ainsi que la carte du plasmide pCR®4-TOPO®, sont présentés en annexes 6 et 7.

3. Cytométrie en flux

Dans le cadre de ces travaux, la cytométrie a été utilisée afin d'estimer la viabilité des microorganismes et de les quantifier dans un échantillon, ainsi que pour estimer l'intensité du signal FISH au cours du cycle de croissance.

3.1 Principe

La **cytométrie en flux** (CMF) est une technique qui a vu le jour dans les années 50. Elle est définie comme l'étude de particules isolées (cellules, bactéries...) entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- ✓ aux propriétés optiques intrinsèques des particules, qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à sa structure interne ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc.
- ✓ aux propriétés optiques induites de fluorescence, obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogrammes (un paramètre) ou de cytogrammes (deux paramètres), sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées.

Certains cytomètres en flux permettent de trier physiquement une ou deux populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques. L'analyse multiparamétrique d'une suspension cellulaire hétérogène permet de définir des sous-populations qui peuvent être séparées physiquement de la population globale. Pour cela, des critères de séparation sont déterminés par l'utilisateur (définition des zones d'intérêt du tri) et toute cellule dont les caractéristiques seront comprises entre les valeurs choisies, sera isolée. Dans ce but, la veine liquide sera chargée électriquement, puis fractionnée en une succession de gouttelettes. La gouttelette contenant la cellule à isoler est déviée en passant dans un champ électrostatique et récupérée dans un tube collecteur. Si la cellule appartient à une sous-population non sélectionnée ou si la gouttelette formée ne contient pas de cellule, la veine liquide ne sera pas chargée et la gouttelette éliminée.

3.2 Protocole expérimental

3.2.1 Marquage cFDA

3.2.1.1 Principes

A différents moments lors de nos travaux, nous avons procédé à une quantification des microorganismes par cytométrie en flux. Avant analyse, les échantillons ont été marqués à l'aide de 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate (cFDA).

Le cFDA est une molécule hydrophobe qui devient fluorescente sous sa forme cF (5(6)-carboxyfluorescéine) après hydrolyse des groupements acétate (cf. Figure 32). La membrane cellulaire est relativement perméable au cFDA. Une fois dans la cellule, les groupements acétate sont clivés par des estérases aboutissant à la formation de molécules de cF hautement

fluorescentes. Ces dernières restent dans les cellules du fait de leurs charges négatives. Le cFDA est un marqueur de viabilité, c'est-à-dire qu'il marque exclusivement les cellules vivantes. Il est le plus souvent utilisé afin d'étudier les mouvements de populations cellulaires, estimer la viabilité, et mesurer le pH intracellulaire. En effet l'intensité de la fluorescence est fonction du pH.

Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission du cFDA, ou plus exactement de sa forme cF, sont respectivement de 492 nm et de 516 nm.

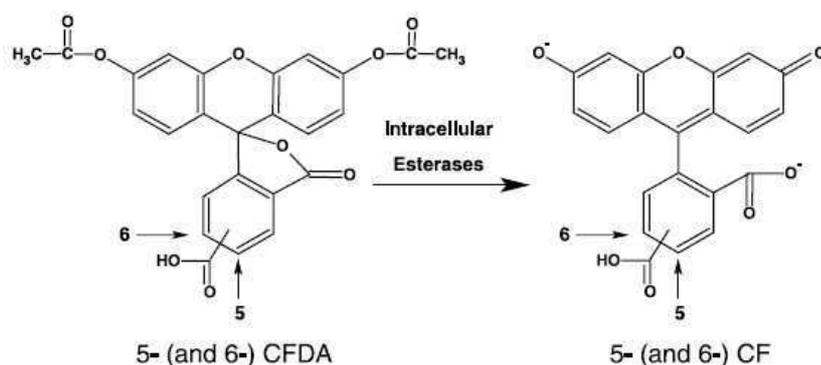


Figure 32 : Réaction d'hydrolyse de la 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate en 5(6)-carboxyfluorescéine par les estérases intracellulaires. (Hoefel *et al.*, 2003)

3.2.1.2 Protocole

Le marquage au cFDA a été utilisé lors des suivis de réacteurs afin de déterminer la concentration des échantillons en microorganismes vivants.

Un prélèvement de 1 mL est centrifugé à 13 000 rpm pendant 1 minute. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 1 mL de tampon B4 (Chemsol), auquel sont ajoutés 10 μL d'une solution de cFDA à 50 μM . Le tube est ensuite agité, incubé 10 minutes à 40°C, puis à nouveau centrifugé 1 minute à 13 000 rpm. Le culot est repris dans 1 mL de tampon B4 et analysé au cytomètre en flux.

Le cytomètre utilisé pour la quantification et le test de viabilité est le BactiFlow multiparamétrique (Chemunex SA) équipé d'un laser argon émettant à 488 nm et refroidi par air. Il est équipé de 4 filtres différents, permettant d'analyser 4 paramètres simultanément :

- Un détecteur de taille (FSC : forward angle light scatter) : mesure la lumière diffractée dans l'axe du laser, combiné à un collecteur
- Un détecteur de granulosité (SSC : side angle light scatter), mesure la lumière diffractée à 90°C et donne des informations relatives à la granulosité des cellules.
- Un filtre de bande passante à 530 nm (515-545 nm), qui collecte la fluorescence verte de la carboxyfluorescéine.
- Un filtre de bande passante à 670 nm, qui collecte la fluorescence rouge.

Une combinaison spécifique de FSC et SSC est utilisée afin de discriminer les bactéries du bruit de fond.

3.2.2 Analyses FISH par cytométrie en flux

Le cytomètre utilisé pour l'analyse FISH est le FAC-Scan (Becton-Dickinson). Ses caractéristiques sont identiques à celle du cytomètre précédent sauf qu'il dispose en plus d'un filtre de bande passante à 585 nm (564-606 nm), qui collecte la fluorescence jaune-orange.

4. Marquage cFDA/SE : suivi de division cellulaire.

4.1 Description

Le suivi de la division cellulaire lors de la filamentation a été effectué grâce au marquage des cellules à l'aide de la 5-(6)-carboxyfluorescéine diacetate succinimidyl ester (cFDA/SE). Cette molécule est la plus utilisée pour le marquage fluorescent des cellules vivantes. Elle diffère du cFDA par la présence d'un groupement succinimidyl ester (SE) ayant une forte affinité pour les amines libres ainsi que pour les groupements amines des protéines intracellulaires. Le cFDA/SE est, comme le cFDA, hydrolysé en une molécule fluorescente, le cF/SE, par les estérases intracellulaires (cf. Figure 33).

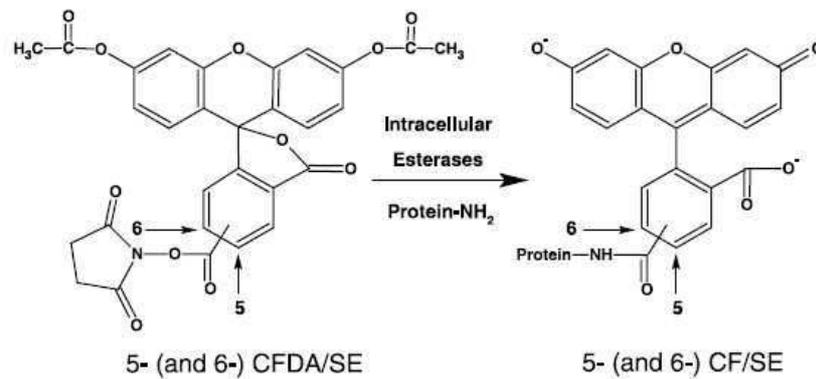


Figure 33 : Réaction d'hydrolyse de la 5(6)-carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester en 5(6)-carboxyfluorescéine succinimidyl ester, par les estérases intracellulaires. (Hoefel *et al.*, 2003)

Le marquage au cFDA/SE est également utilisé pour estimer la viabilité des bactéries (Fuller *et al.*, 2000). Le groupement SE permet à la molécule fluorescente (cF/SE) de s'ancrer dans la cellule. Ceci évite toute fuite ou expulsion de la molécule fluorescente par la cellule. On a de cette façon un marquage très stable dans le temps. Le cFDA/SE permet ainsi de suivre le déplacement des microorganismes dans des milieux complexes tels que des eaux souterraines (Fuller *et al.*, 2001). Il est également utilisé, de la même façon que dans les travaux ici décrits, pour suivre la division cellulaire des microorganismes (Ueckert *et al.*, 1997).

4.2 Protocole de marquage

Le protocole de marquage est identique à celui décrit par le cFDA.

4.3 Observation et acquisition des images

Les observations sont réalisées sur un microscope Leitz Laborlux S, équipé d'une lampe à mercure haute pression HBO de 50W. Il est équipé d'un oculaire de 12.5X et les observations ont été effectuées en utilisant les objectifs X40 et X100 sous immersion dans l'huile. Les acquisitions d'images sont effectuées à l'aide d'un appareil photographique numérique Nikon installé sur le microscope.

5. Protéomique

La partie protéomique de ces travaux consiste en une étude de l'expression protéique de *Sphaerotilus natans*, lors de sa croissance sous formes monocellulaire et filamenteuse.

5.1 Extraction des protéines

Le protocole d'extraction des protéines totales utilisé est très largement inspiré de la technique décrite par Laemmli (Laemmli, 1970). Elle consiste en une lyse des cellules et une solubilisation des protéines dans un tampon dénaturant.

Les extractions sont réalisées sur 2 mL de culture, soit environ 250 mg de biomasse. La suspension cellulaire est centrifugée à 13 400 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot est repris dans 1 mL de PBS. Cette étape de lavage est répétée 2 fois. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 500 μ L de tampon SSB.

Composition du tampon SSB :

- ✓ 125 mM de Tris-HCl pH 6,8
- ✓ 2% de SDS
- ✓ 10% de glycérol
- ✓ 0,02% de bleu de bromophénol
- ✓ 100 mM de DTT
- ✓ 1 mM de PMSF

Le DTT (Dithiothreitol) est un agent permettant la réduction des ponts disulfures. Le SDS est un détergent anionique fort qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges vont se repousser et déplier les chaînes polypeptidiques. Le SDS confère une densité de charges constante le long de la chaîne polypeptidique, ce qui autorise une séparation selon la masse moléculaire apparente dans un champ électrique. Le PMSF (phénylméthanesulphonyl fluoride) est un inhibiteur de protéase.

La suspension cellules+SSB est alors passée aux ultrasons 3 fois 30 secondes dans la glace, incubée 5 minutes au bain-marie à 100°C, puis centrifugée 10 minutes à 13 400 rpm. Le surnageant, contenant maintenant les protéines solubles, est recueilli et conservé à -20°C.

Les protéines ainsi obtenues sont :

- Dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle
- Sous forme monomérique : conséquence de la rupture des ponts disulfures.

5.2 Dosage des protéines

La concentration des extraits protéiques est déterminée, comme pour l'ADN et l'ARN, à l'aide du système Qubit (Invitrogen-Molecular Probes) et du kit Quant-iT™ Protein Assay (Invitrogen-Molecular probes). Ce kit comprend le marqueur spécifique des protéines, le tampon de réaction et les échantillons standards de BSA nécessaires à la calibration de l'appareil.

5.3 Analyses SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

On parle aussi d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes. Cette dernière a également été décrite par Laemmli et est à ce jour une des références les plus citées dans la littérature scientifique.

Ce type d'électrophorèse sur gel d'acrylamide a pour but de permettre la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. Le gel est dit réticulé et est obtenu par polymérisation d'acrylamide, qui forme des chaînes, et de bis-acrylamide, qui pontent les chaînes d'acrylamide. Plus la concentration en acrylamide est élevée et plus la densité des chaînes est importante, et moins les protéines volumineuses vont pouvoir migrer dans le gel (cf. Tableau 10).

Pourcentage en acrylamide du gel	Gamme de séparation (en kDa)
7,5	45-400
10	22-300
12	13-200
15	2,5-100

Tableau 10 : Gammes de séparation des protéines sur gels dénaturant d'acrylamide en fonction de la concentration en acrylamide.

Lors de nos expériences, nous avons utilisé des gels concentrés à 10% en acrylamide, en utilisant le système Mini-PROTEAN II (Bio Rad) (cf. Figure 34).

- 40 % Acrylamide/Bis solution, 37,5: 1 (2,6% C).....1,34 mL
- Tris 0,5M.....2,5 mL
- Eau MilliQ.....6,11 mL
- SDS 20%.....50 µL
- TEMED.....5 µL
- Persulfate d'ammonium.....50 µL

Un peigne est enchâssé entre les plaques, dans le gel de concentration avant que celui-ci ne polymérise. Après au moins 45 minutes, le peigne est retiré. Les gels et leurs supports sont placés dans la cuve à électrophorèse qui a préalablement été remplie au quart de tampon de migration dilué 10 fois (1X). L'électrophorèse s'effectue sous l'action d'un champ électrique de 120 V et 150 mA.

Composition du tampon de migration à 10X :

- SDS1%
- Tris250 mM
- Glycine.....1,92 M
- Eau MilliQ.....qsp 1L

Le pH est ajusté à 8,3 à l'aide d'HCl.

La migration complète est accomplie en 45 à 60 minutes. Le gel est alors démoulé et plongé dans une solution de bleu de Coomassie pendant 5 minutes sous agitation. Il est ensuite transféré pendant 1 heure et sous agitation dans une solution composée à 50% de méthanol et 10% d'acide acétique, puis enfin 1 nuit dans une solution composée 5% de méthanol et 10% d'acide acétique. Ces solutions vont avoir pour effet d'éliminer l'excès de bleu de Coomassie du gel, seul celui fixé aux protéines sera retenu. Mais elles vont également permettre de fixer les protéines sur le gel en les dénaturant de façon irréversible dans les mailles du gel.

La révélation est réalisée sur Gel Doc (Bio Rad). La visualisation ne nécessite pas l'emploi d'UV et c'est pourquoi un filtre est placé sur le transilluminateur afin de transformer les UV en lumière blanche.

Un marqueur de taille est déposé sur le gel en même temps que les échantillons protéiques afin de pouvoir estimer visuellement la masse moléculaire des protéines de l'échantillon.

5.4 Analyses protéiques par LC-MS/MS

Des analyses en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ont été menées sur les échantillons protéiques totaux extraits des cultures de *Sphaerotilus natans*, ainsi que sur des bandes découpées à partir de gels de protéines (SDS-PAGE) afin d'identifier des protéines différemment exprimées lorsque la bactérie adopte l'une ou l'autre des deux morphologies.

5.4.1 Présentation de la technique de LC-MS-MS

5.4.1.1 Historique

La spectrométrie de masse est une technique qui tire son principe des découvertes de Sir J.J. Thompson, physicien britannique de la fin du XIX^{ème} et début du XX^{ème} siècle qui découvrit l'électron. Il inventa un spectrographe de masse et obtint les premiers spectres de masse de gaz, N₂, O₂ et CO entre autres. Il reçut le prix Nobel en 1906. Le premier spectromètre de masse fut construit en 1918 par A.J. Dempster. La technique a connue de nombreuses améliorations, notamment à la fin des années 1980 où deux méthodes, permettant la désorption-ionisation douces des macromolécules biologiques pour une analyse en spectrométrie de masse ont vu le jour. Ces dernières ont valu à leurs inventeurs, l'américain J.B. Fenn et le japonais K. Tanaka, l'obtention du prix Nobel de Chimie en 2002.

5.4.1.2 Principes généraux de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse permet une mesure précise et sensible de la masse de biomolécules telles que les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les sucres ou les lipides. Cette méthode détermine des rapports masse sur charge, m/z , de molécules ionisées^e.

Il existe différents types de spectromètre de masse. Chacun peut être divisé schématiquement en quatre parties distinctes :

^e m correspond à la masse du composé et z à sa charge.

- **Une source d'ions** : enceinte au sein de laquelle des ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé.
- **Un analyseur** : dont l'objet consiste à mesurer pour chacune des espèces issues de la source d'ions, le rapport entre sa masse (m) et son nombre de charge (Z). L'analyseur sépare donc les molécules en fonction de leur rapport m/z en modifiant leur trajectoire au sein de l'analyseur.
- **Un détecteur** : il convertit en grandeurs électriques le signal correspondant aux ions l'ayant atteint. Il compte les ions en leur associant leur rapport m/z .
- **Un enregistreur** : permet l'acquisition, le traitement et l'enregistrement du signal ainsi que la visualisation des spectres.

Différents types d'analyseurs de masse tels que le TOF (temps de vol), le quadripôle, la trappe à ions, et la cellule ICR peuvent être associés entre eux : on parle alors de spectromètre de masse en tandem. Cette combinaison d'analyseurs permet de fragmenter des molécules et d'analyser les fragments produits.

5.4.1.3 Principe de la source electrospray

La première étape de l'analyse consiste à introduire les molécules à analyser. Il existe différents modes d'ionisation. Seul le mode d'ionisation utilisé dans le cadre de ces travaux sera décrit. Il s'agit d'une ionisation de type ESI ou "Electrospray Ionisation" (cf. Figure 35). Le principe de ce mode d'ionisation (Fenn, 1984; Fenn *et al.*, 1989) repose sur l'introduction de composés en solution via un capillaire fin porté à un potentiel de quelques kilovolts. La tension présente au niveau du capillaire crée des charges dans la solution, formant alors un spray, ou nébulisa de fines gouttelettes, évaporées progressivement par un flux d'azote à contre courant. Les gouttelettes vont traverser simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse, produisant des ions en phase gazeuse portant plusieurs charges. Les ions sont transférés de la source, opérant à pression atmosphérique, à l'analyseur opérant sous un vide plus ou moins poussé selon l'analyseur de masse utilisé.

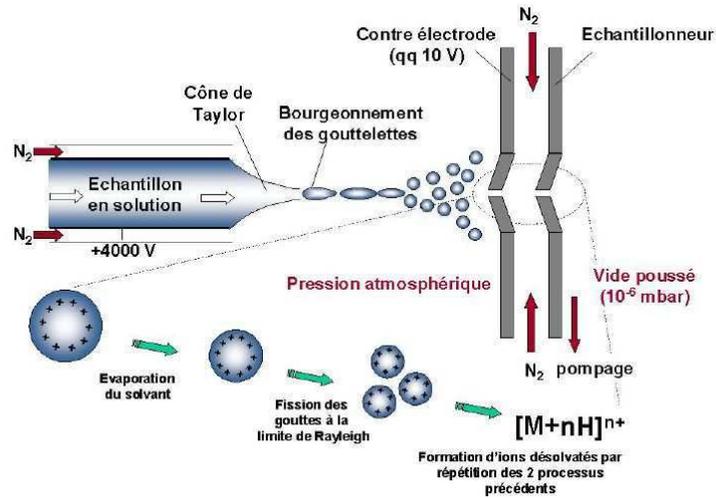


Figure 35 : Schémat du principe d'ionisation des molécules par Electrospray (ESI). Illustration extraite de (Vinh, 1999)

5.4.1.4 La spectrométrie de masse en tandem

Dans un premier temps, les ions formés dans la source entrent dans l'analyseur. Un ion particulier, appelé ion précurseur, et issu de la source, est sélectionné en fonction de son rapport m/z. Il est ensuite transféré dans une cellule de collision où il est fragmenté par collision contre des molécules de gaz inerte : dans notre cas de l'Hélium. Les nouveaux ions ainsi formés sont appelés ions "fragments" ou "fils". Leurs rapports m/z sont ensuite analysés par le second analyseur.

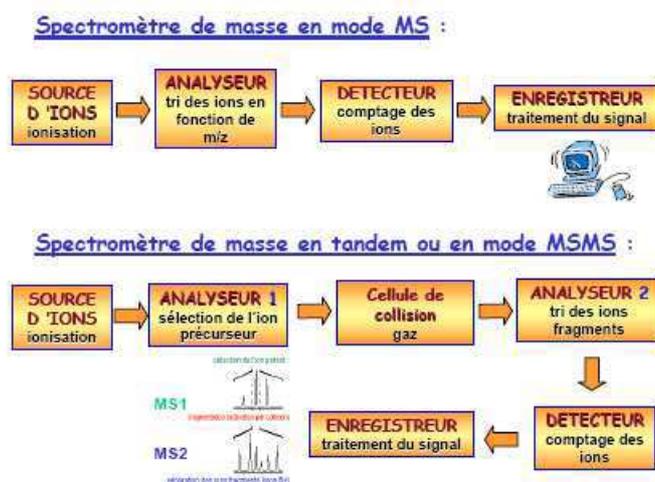


Figure 36 : Schéma du principe des spectromètres de masse en mode MS et MSMS.

Dans ce type de spectromètre les différentes étapes que sont l'isolement, la fragmentation et l'analyse des fragments, sont réalisées dans des parties distinctes de l'instrument. (cf. Figure 36).

5.4.1.5 Trappe ionique et MS/MS

Il existe également un type d'analyseur dans lequel l'ensemble du processus est réalisé dans un même endroit, la trappe à ions. Dans ce cas l'isolement de l'ion précurseur, son excitation, sa fragmentation et l'analyse des fragments s'effectuent successivement au sein du piège, suivant une séquence temporelle.

Activité au sein d'une trappe ionique :

Au sein d'un piège quadripolaire de type trappe d'ions, l'analyse en tandem se réalise dans un premier temps par sélection d'ions dont la valeur m/z est choisie. Ces ions piégés vont ensuite se fragmenter par collision (acquisition d'énergie interne et excitation vibrationnelle) à l'aide d'une tension de radiofréquence (RF) correspondant à leur fréquence de résonance. Les ions formés sont à leur tour piégés. Une éjection sélective en masse des ions produits (fragments) peut alors être réalisée en vue de leur analyse. L'obtention d'ions de générations supérieures est possible par simple renouvellement du processus (sélection d'un ion produit, fragmentation, sélection d'un ion produit de 2^e génération, fragmentation, etc.). Cette séquence est appelée MS^n , n étant le nombre de générations d'ions.

Dans l'étude réalisée, le spectromètre possède une trappe ionique linéaire LTQ (Linear Trap Quadrupole) (THERMO Electron). Dans le cas du LTQ, la trappe ionique se présente sous forme linéaire, on parle de piège 2D (cf. Figure 37).

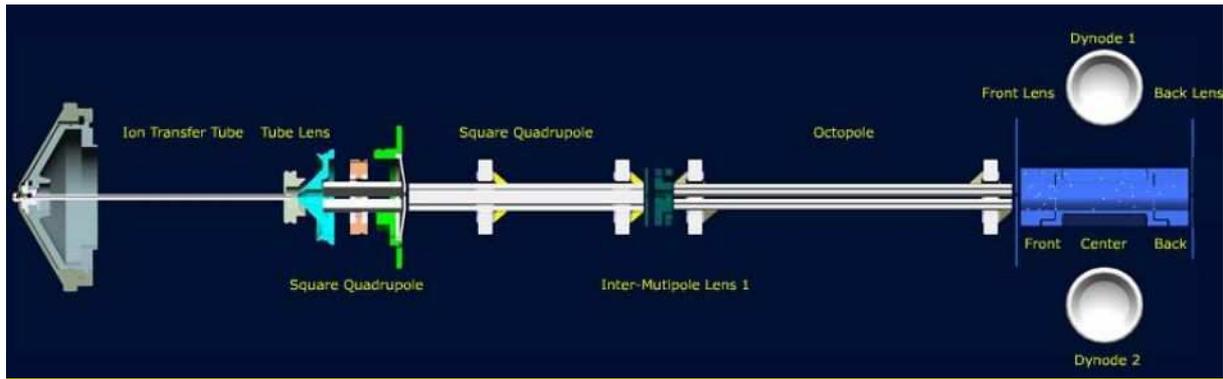


Figure 37 : Représentation schématique du spectromètre de masse en tandem LTQ (Thermo Electron) et de sa trappe d'ions linéaire (2D).

Les applications de la MS/MS sont multiples en biologie. Elle est notamment employée pour l'identification des protéines ainsi que pour la recherche de leurs modifications post traductionnelles. Ce sont en générales les peptides générés par trypsinolyse des protéines qui sont étudiés en spectrométrie de masse. Dans notre cas, les échantillons ont été digérés par la trypsine, aboutissant à la formation de peptides se terminant, à leur extrémité C-terminale, par une Arginine (R) ou une Lysine (K). L'hydrolyse par cette enzyme est la plus répandue car au vue de l'abondance en arginine et lysine dans les protéines, les peptides générés sont majoritairement d'une taille optimale pour être ionisés et fragmentés en CID. Dans le cas de l'étude de peptides, les ruptures se font essentiellement au niveau de la liaison peptidique (cf. Figure 38). Cette fragmentation a été bien étudiée et répertoriée. La fragmentation des peptides peut produire 3 types d'ions fils qui contiennent l'amine terminal du peptide (nommés a, b, c), et 3 types d'ions qui contiennent le carboxyle terminal du peptide (nommés x, y, z). Avec une faible énergie de collision les ions b et y sont les plus fréquemment observés.

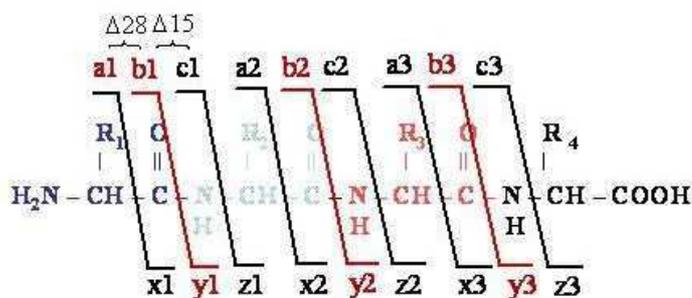


Figure 38 : Différentes possibilités de fragmentations pour un térapeptide. (Bieman, 1990)

Les profils de fragmentation obtenus donnent des informations de structure. Dans notre cas, les séquences peptidiques sont déduites des données de fragmentation après extraction et analyse de la masse du peptide précurseur sélectionné et de ces ions fragments associés. (cf. Figure 39).

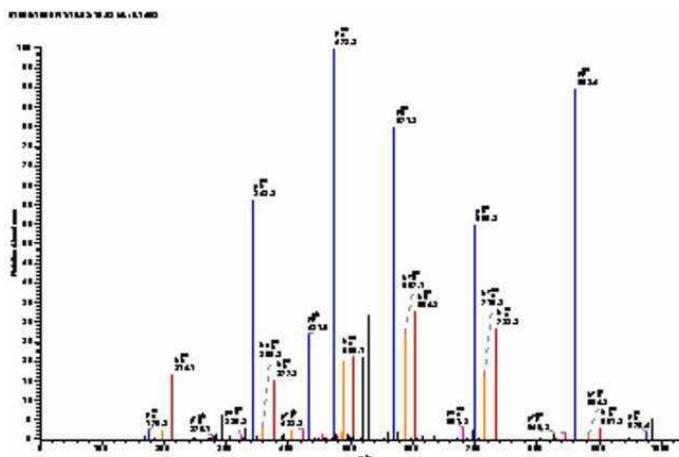


Figure 39 : Exemple de spectre MS/MS d'un peptide bi-charge produit sur LTQ

La fragmentation sur LTQ par collision contre l'hélium (CID = collision induced dissociation) est particulièrement efficace sur des peptides de masse comprise entre 600 et 2 500 Daltons. Des mélanges protéiques complexes peuvent être ainsi analysés, qu'il s'agisse d'extraits protéiques, de spots d'électrophorèse bidimensionnelle, ou encore comme dans notre cas de bandes issues de gel SDS-PAGE.

5.4.1.6 Séparation chromatographique des peptides

Très souvent, et comme cela a été le cas pour les travaux réalisés, le spectromètre de masse est couplé à une chaîne chromatographique. On parle dans ce cas de LC-MS/MS. L'étape chromatographique a pour objet d'opérer une séparation préalable du mélange de peptide avant son introduction dans le spectromètre de masse. Classiquement, la séparation des peptides est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une nano-colonne à polarité de phase inversée de type C18.

Cette configuration présente de nombreux avantages pour l'analyse des peptides.

- ✓ une concentration du peptide

- ✓ un couplage direct entre la chaîne de chromatographie et le spectromètre de masse par une source nano-électrospray.
- ✓ une analyse efficace de mélanges de peptidiques complexes : chaque peptide élué à un temps de rétention donné, est analysé en fournissant des informations de séquence, conduisant à l'identification des protéines distinctes.

Dans certains cas, essentiellement sur des génomes séquencés, il est possible d'analyser l'ensemble des protéines exprimées par une cellule (Yates 3rd *et al.*, 1999). Pour cela, des systèmes chromatographiques multidimensionnels (MDLC) en ligne sont utilisés et combinent en général au moins deux principes séparatifs distincts. Généralement une première séparation des peptides est réalisée sur colonne échangeuse de cations, suivi d'une séparation sur colonne à polarité de phase inversée. On parle dans ce cas de chromatographie multidimensionnelle de type 2DLC-MS/MS.

5.4.1.7 Analyse des données de spectrométrie de masse

L'analyse des spectres de fragmentation (MS/MS) dépend du type de spectromètre de masse et plus particulièrement de la résolution et de la précision obtenue sur la masse des ions fils. Cette analyse de données peut être réalisée par différents types de logiciels spécialisés qui conduisent à valider la présence de protéines au sein d'un échantillon. Il existe donc différentes procédures qui conduisent à l'identification des protéines et ce systématiquement contre une base de données. Certains modes d'analyses des données permettent d'identifier un peptide en s'affranchissant de l'étape d'attribution des ions fils du spectre de fragmentation. D'autres approches nécessitent une interprétation complète ou partielle d'un spectre de fragmentation, afin de le traduire en séquences primaires d'acides aminés. Dans notre cas, nous avons utilisé la suite logiciel Bioworks Browser 3.3 (SEQUEST, Thermo Electron) qui est basée sur la comparaison de liste de masses. Cette approche ne nécessite pas d'étape d'interprétation du spectre de fragmentation. Le logiciel classe les peptides et les protéines identifiés à l'aide de différents scores. Le programme SEQUEST procède en plusieurs étapes : la première consiste à filtrer les spectres trop peu informatifs car pauvres en ions fils pour fiabiliser les identifications et traiter rapidement plusieurs milliers de spectres successivement. L'étape suivante consiste à pré-sélectionner dans une base de données des séquences peptidiques candidates ayant une masse proche des ions précurseurs sélectionnés. Pour chacune des séquences pré-sélectionnées, le logiciel crée une liste de fragments b et y

théoriques et la compare à la liste des fragments expérimentaux (cf. Figure 40). L'analyse de corrélations croisées s'exprime par un score, XCor, qui est dépendant de l'état de charge du peptide avant fragmentation.

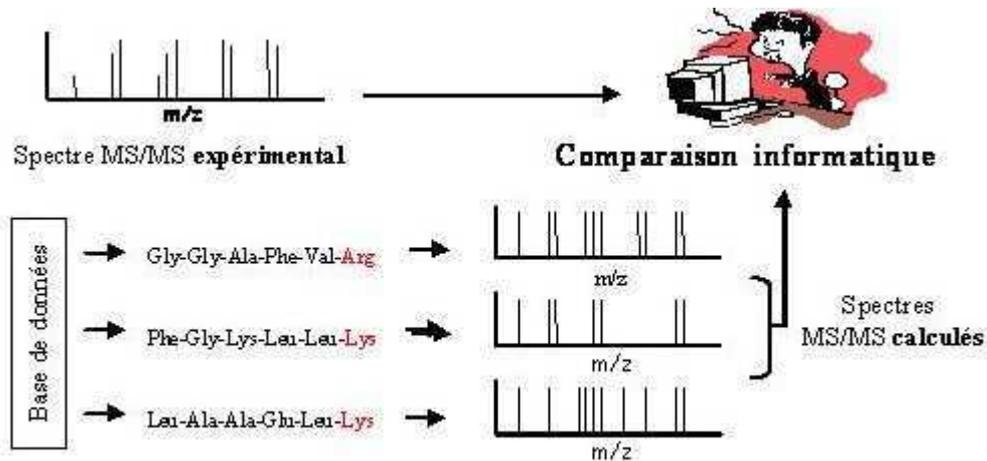


Figure 40 : Comparaison d'un spectre expérimental MS-MS avec des spectres théoriques de peptides sélectionnés dans les bases de données, d'après (Tabb *et al.*, 2001).

Ce type d'approche est particulièrement bien adapté à l'exploitation de nombreux spectres MS/MS. Cependant, elle présente certaines limites et ne peut aboutir à une identification dans certains cas :

- ✓ Quand le peptide est modifié : la masse du précurseur étant différente, la séquence ne peut pas être attribuée correctement.
- ✓ Quand la séquence du peptide est absente de la base de données

Les peptides validés sont ensuite associés à différentes protéines dont ils sont potentiellement issus.

5.4.2 Protocole expérimental et données techniques

Les protéines extraites suivant la procédure décrite par Laemmli (1970), sont séparées comme décrit précédemment sur un gel dénaturant SDS-PAGE. Le gel est coloré à l'aide de Bleu de Coomassie (Sigma-Aldrich France). Les régions du gel étudiées ont été découpées et lavées deux fois à l'aide d'une solution de NH_4HCO_3 50 mM et acétonitrile 50%. Les morceaux de gel sont séchés à température ambiante. Ils sont ensuite digérés par 0,1 μg de

Trypsine (Promega) durant une nuit à 37°C puis resuspendus dans une solution de NH_4HCO_3 50 mM. Les peptides libérés dans le tampon sont regroupés avec les peptides issus de 3 étapes additionnelles d'extraction des peptides du gel :

- Une avec 25 μL de NH_4HCO_3 50 mM
- Une avec 25 μL d'une solution contenant 1% d'acide formique et 50% d'acétonitrile
- Une avec 25 μL d'une solution contenant 1% d'acide formique et 90% d'acétonitrile

Les peptides sont ensuite séchés à l'aide d'un Speed-Vacuum pendant 1 heure puis solubilisés dans 25 μL d'une solution contenant 0,08% d'acide trifluoroacétique et 2% d'acétonitrile. Puis 4 μl du mélange peptidique sont ensuite injectés et analysés par nanoLC-MS/MS.

La séparation des peptides sur nanoLC a été réalisée avec une chaîne Ultimate 3000 (Dionex), connectée par une source d'ionisation nanoélectrospray au spectromètre de masse LTQ (Thermo Fisher). Le mélange de peptides tryptiques, injecté à 20 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$, est piégé sur une précolonne PepMap C18 (0,3x5 mm, 3 μm , 100A; Dionex). Après 4 minutes, la précolonne a été connectée à une nanocolonne de séparation Pepmap C18 (0,075 x 150 mm, 100A, 3 μm , Dionex). Les peptides sont principalement séparés par un gradient linéaire de 2 à 36% de tampon B (0,1% acide formique, 80% acétonitrile) en 90 minutes à 0,3 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. La durée totale du gradient est de 145 minutes. L'établissement du spray a été réalisé par application d'une différence de potentielle de 1,3 kiloVolts au moyen d'une jonction liquide sur un capillaire non-coaté (PicoTip EMITER 10 μm tip ID ; New objective). Les peptides ionisés sont ensuite analysés au niveau du spectromètre de masse par une méthode 'data dépendante' que l'on peut décomposer en trois étapes :

- 1) Balayage en MS sur la gamme de masse 300-1500
- 2) Balayage en masse lent avec une plus grande résolution (ZoomScan des 3 ions majoritaires) qui permet de définir l'état de charge de l'ion précurseur sélectionné nécessaire au calcul de sa masse
- 3) Fragmentation : MS/MS sur les 3 ions les plus intenses, précédemment sélectionnés.

Les peptides sont fragmentés par application d'une énergie normalisée de collision fixée à 40% sur les ions mono, di et tri chargés uniquement.

L'identification des protéines a été réalisée à l'aide du logiciel Bioworks 3.3 (Thermo Fisher) en confrontant automatiquement les spectres à une base de données regroupant toutes les séquences protéiques de β -protéobactéries déposées dans GenBank. Cette base de données établie le 8/07/2007 et comprenant 203003 séquences protéiques, a été au préalable clustérisée, ou condensée, à 95% à l'aide du programme CD-HIT. Ceci permet d'éliminer une partie de la redondance en regroupant les protéines présentant 95 à 100% d'homologie sous une seule référence.

Les paramètres de confrontation en base de données utilisés sont pour les peptides :

- d'être spécifiquement issus d'une hydrolyse trypsique avec au maximum un seul clivage manqué
- de présenter comme modification variable une oxydation pour la méthionine
- d'avoir une tolérance de masse fixée à 1,4 Da pour la masse précurseur
- et une tolérance de masse de 0,5 Da pour les fragments produits expérimentaux

Les résultats de la recherche sont également filtrés pour ne garder que les séquences peptidiques les plus fiables :

- Avec un filtre à seuils multiples appliqué aux Xcorr de 1,7, 2,5 et 3,0 respectivement pour les peptides mono-, di- et tri-chargés,
- Une probabilité pour les peptides inférieure à 0,01,
- Un ΔC_n supérieur à 0,1.

Une évaluation de l'abondance peut être réalisée en comptant le nombre de spectres de masse attribué à une protéine identifiée, ou méthode dite de "spectral counting" (Zybailov *et al.*, 2005). Cette première ébauche d'étude comparative ne peut être réalisée que si les échantillons ont été analysés dans des conditions opératoires rigoureusement identiques du point de vue de la séparation en chromatographie, de l'acquisition et du traitement des données produites en spectrométrie de masse.

Chapitre 3

Résultats et Discussions

1. Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de la filamentation chez *S. natans*

La croissance sous forme de filaments est rencontrée chez de nombreux microorganismes tels que les bactéries, les levures ou encore les champignons. Jusqu'à présent, les études concernant ces microorganismes filamenteux, et notamment les bactéries des boues activées, portaient essentiellement sur leur identification, leurs caractéristiques morphologiques, leur impact, positif ou négatif, sur le traitement des eaux usées en boues activées ou bien encore les facteurs induisant leur prolifération. Concernant les bactéries filamenteuses, les microbiologistes ont longtemps cru qu'elles n'existaient que sous la forme de filament. Durant les vingt dernières années, les progrès en matières d'observation microscopique et d'identification, avec notamment l'émergence des techniques de biologie moléculaire, ont permis de mettre en évidence qu'un grand nombre de ces bactéries peuvent également exister à l'état unicellulaire en fonction de certains paramètres environnementaux. C'est le cas de *Microthrix parvicella* (Foot *et al.*, 1992), Eikelboom type 021N (Foot *et al.*, 1992), type 0092 (Buali & Horan, 1989), types 1863 et 0803 (Seviour *et al.*, 1994). Des expériences sur des cultures pures de bactéries filamenteuses de collection (Gaval, 2001a) mais aussi issues de boues activées (Ramoithokang *et al.*, 2006b) ont montré que le passage d'une forme de croissance à l'autre était possible en faisant varier les conditions de culture.

Il est maintenant clairement établi que la croissance filamenteuse est une forme d'adaptation des microorganismes face à un environnement hostile (Hahn *et al.*, 1999), une situation de stress (Radcliffe *et al.*, 1997; Mattick *et al.*, 2000), une faible concentration en substrat ou d'un important déséquilibre du ratio C/N (Chudoba *et al.*, 1973; Gagiano *et al.*, 2002), un déficit en oxygène (Gaval, 2001a; Gaval & Pernelle, 2003), ou encore une température élevée (Rossetti *et al.*, 2002). Cette forme de croissance particulière permet une coopération des cellules leur assurant un avantage compétitif. Les filaments offrent également la possibilité aux bactéries d'aller chercher les éléments essentiels à leur croissance plus loin dans le milieu, et notamment en dehors du floc.

Les grandes questions qui ont guidé ces travaux ont été de savoir comment se déroule la formation des filaments à partir d'une population de cellules individuelles et quels sont les mécanismes physiologiques et moléculaires mis en œuvre lors de l'orientation vers ce mode de croissance particulier.

1.1 Isolement par micromanipulation d'une souche de *S. natans* à partir de boues activées

1.1.1 Identification de l'espèce bactérienne

Durant la période de la thèse, un seul échantillon de boues activées présentant un foisonnement filamenteux dû à la bactérie *Sphaerotilus natans* a pu nous être fourni, en provenance de la station de traitement des eaux usées d'une industrie agroalimentaire. Il s'agit d'un site d'embouteillage de sirops et jus de fruits. L'effluent présente donc un déséquilibre C/N très important, avec une forte concentration en sucre.

La bactérie a, en premier lieu, été identifiée par une mise en évidence des caractéristiques morphologiques spécifiques de *S. natans* : filaments longs, rigides et faussement ramifiés, constitués de cellules allongées en bâtonnet d'environ 4 à 5 μm de longueur. Une coloration a également permis de déterminer que ces filaments étaient composés de bactéries Gram-négatives.

Une hybridation fluorescente *in situ* a également été effectuée sur ces mêmes boues afin de confirmer la présence de la bactérie en effectuant un double marquage à l'aide des sondes EUB338 marquée au FITC et SNA marquée au Cy3 (cf. Figure 41).

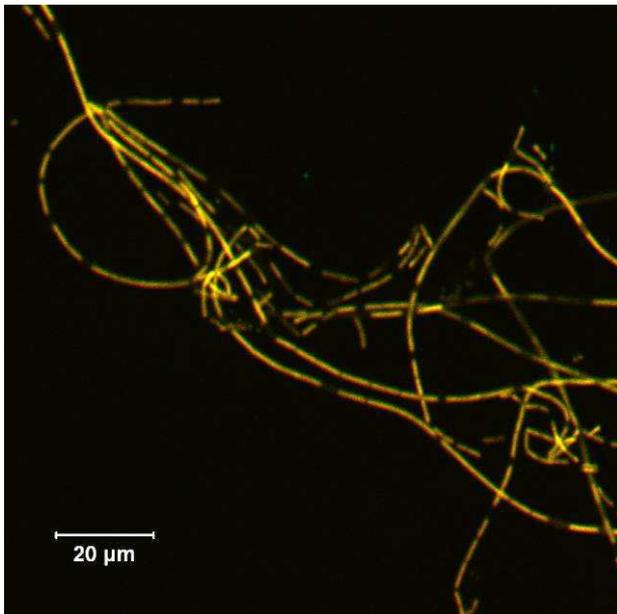


Figure 41 : Bactéries filamenteuses de type *Sphaerotilus natans* dans les boues activées issues de la station de traitement des eaux usées d'une usine agroalimentaire. Double marquage FISH à l'aide des sondes EUB338-FITC et SNA-Cy3.

Les filaments observés dans ces boues activées s'hybrident avec les deux sondes EUB338 et SNA, comme le montre la couleur jaune-oranger obtenue par l'addition des deux fluorophores

Cy3 et FITC (cf. figure 41). Les différentes analyses et observations confirment donc que la bactérie responsable de la prolifération filamenteuse appartient bien à l'espèce *Sphaerotilus natans*.

1.1.2 Isolement de la souche par micromanipulation

Afin d'isoler la bactérie en question par micromanipulation, les échantillons de boues activées ont été dilués au 10^{ème} dans de l'eau ultrapure, puis vortexés à vitesse maximale 3 fois 10 secondes. Une goutte de cette suspension est ensuite déposée sur une lamelle en verre préalablement lavée à l'éthanol. Cette lamelle est ensuite montée sur le microscope Zeiss Axiovert 200M décrit dans le chapitre précédent, équipé d'une station de micromanipulation. Les microcapillaires utilisés pour aspirer les microorganismes sont de type CustomTips Type II[®] (cf. Figure 42 A). Différents types de capillaires ont été testés, mais il s'avère que ce sont les plus adaptés pour l'isolement de bactéries. Ils sont d'ordinaire destinés à la contention de cellules en suspension (ovocytes ou blastocytes). Ces capillaires, représentés dans la figure 43, ont un diamètre intérieur de 5 µm et un diamètre extérieur de 10 µm. Dans notre cas ils sont droits et ne présentent pas de coude (angle D=0). Ces microcapillaires sont montés sur un porte-capillaire, lui-même relié à un microinjecteur (cf. Figure 42 B).

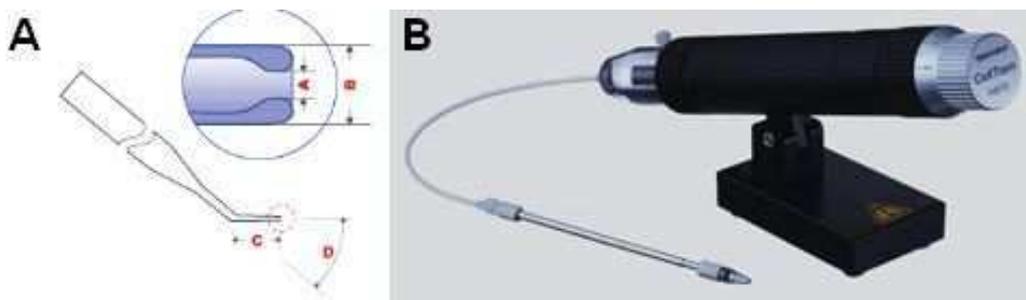


Figure 42 : A) Schéma des microcapillaires CustomTips type II utilisé pour l'isolement de *Sphaerotilus natans* à partir de boues activées. Les capillaires utilisés ont un diamètre interne A de 5 µm et un diamètre externe B de 10 µm et sont droits. B) Photographie du porte-capillaire et microinjecteur hydraulique Celltram[®] Oil utilisé.

L'aspiration est réalisée grâce à un microinjecteur manuel hydraulique de type CellTram[®] Oil (Eppendorf). Le flux de liquide dans le capillaire est contrôlé par rotation d'un bouton. L'huile

utilisée pour transmettre les variations de pression est une huile minérale (Sigma M-8410) possédant une compatibilité biologique, testée sur des embryons de souris.

Des filaments courts et des cellules dispersées ont ainsi été isolés par ce système de micromanipulation (cf. Figure 43).

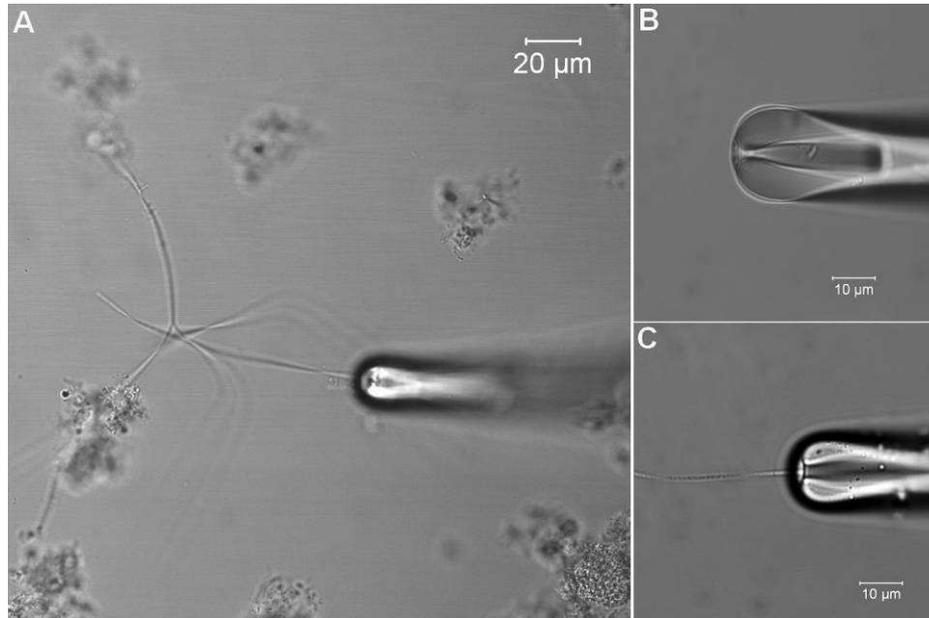


Figure 43 : Photographies illustrant l'isolement par micromanipulation d'une souche de *S. natans* à partir de boues activées (A et C) sous forme de filaments et (B) de cellules dispersées. L'aspiration des microorganismes se fait à l'aide d'un microcapillaire.

Une fois le microorganisme aspiré dans le capillaire, ce dernier est retiré de la goutte de suspension cellulaire. Le capillaire est ensuite plongé dans une goutte de SDS 1%, afin d'éliminer les microorganismes qui auraient éventuellement adhéré au capillaire, puis successivement dans 3 gouttes d'eau stérile afin d'éliminer le surplus de détergent. Il est ensuite plongé dans un microtube de 200µL contenant 50 µL de bouillon CGYA préalablement stérilisé, dans lequel le microorganisme aspiré est rejeté. Le tube est refermé à l'aide d'un bouchon en cellulose, préalablement stérilisé par autoclavage et permettant le passage de l'air, puis placé à 30°C, sous agitation modérée (100 rpm), pendant 48 heures. Les 50 µL de culture sont ensuite transférés dans un tube contenant 150 µL de bouillon CGYA stérile, puis incubés à 30°C sous agitation modérée (100 rpm) pendant 24 heures. 100µL sont ensuite étalés sur gélose CGYA et 100 autres µL transférés dans un tube contenant 10 mL de bouillon CGYA. Sur cinquante prélèvements effectués, seulement deux ont permis d'isoler la souche de *S. natans* présente dans l'échantillon.

Une hybridation fluorescente *in situ* du microorganisme isolé a été effectuée avec la sonde SNA-Cy3 afin de vérifier qu'il s'agissait bien d'une souche de *S. natans* (cf. Figure 44).

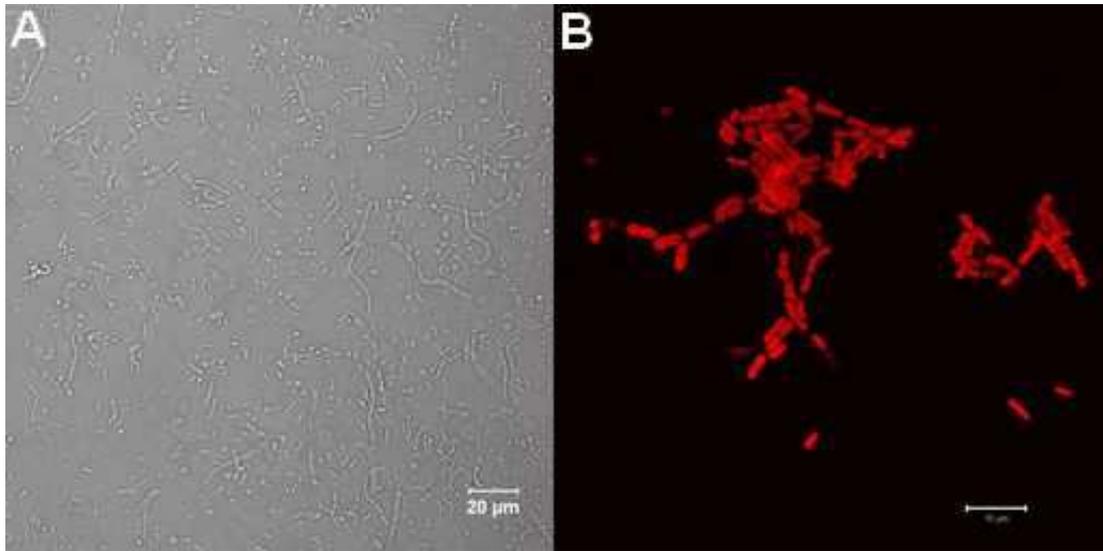


Figure 44 : Photographies de la souche de *S. natans* isolée par micromanipulation A) en DIC après culture sur gélose CGYA et B) en épifluorescence après hybridation *in situ* avec la sonde SNA-Cy3.

On constate que l'ARNr 16S de la bactérie s'hybride avec la sonde SNA, ce qui indique que cette bactérie appartient très certainement à l'espèce *S. natans*.

1.1.3 Conclusions

Cette technique d'isolement par micromanipulation, reposant sur l'aspiration des microorganismes dans un capillaire en verre a permis d'isoler une souche de *S. natans* à partir d'un environnement aussi complexe que les boues activées. Peu de travaux d'isolement de microorganismes par cette technique ont jusqu'à aujourd'hui été réalisés (Fröhlich & König, 1999; Fröhlich & König, 2000; Ishøy *et al.*, 2006). Cette technique pourrait être une alternative efficace à la technique d'isolement classique par dilution et culture, avec laquelle la bactérie n'a pas pu être isolée à partir des boues activées dans lesquelles elle avait pourtant été détectée par FISH. Ces techniques classiques n'avaient pas non plus donné de résultat pour d'autres auteurs (Gaval *et al.*, 2000b).

Bien que possible, l'isolement de longs filaments par cette technique reste délicat (cf. Figure 45). En effet, le diamètre interne du capillaire (5µm) nécessite d'aspirer le filament par une de ses extrémités. Du fait de leur grande taille, les filaments sont très souvent liés entre eux et aux floccs. Leur aspiration entraîne donc souvent de nombreux autres éléments. Un autre

problème vient de l'adhérence des bactéries au verre, et notamment des filaments. Certains, et en particulier *S. natans*, sont entourés de polysaccharides qui leur confèrent une forte adhérence au capillaire.

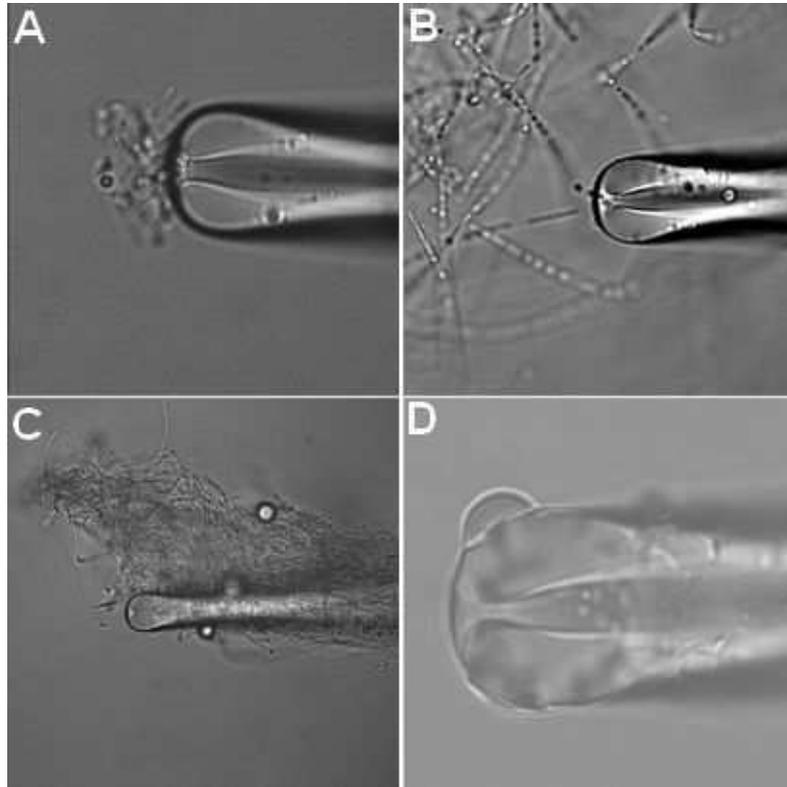


Figure 45 : Illustration des différents types de problèmes rencontrés lors de l'isolement de bactéries filamenteuses en boues activées par la technique d'aspiration par microcapillaire. A) obturation de l'orifice du capillaire par des particules B) Enchevêtrement de filaments C) Adhésion des filaments le long du capillaire D) Adhésion de cellules et de particules autour du capillaire.

Une sylanisation des microcapillaires a été réalisée afin d'empêcher cette adhérence des microorganismes. Après ce traitement les bactéries n'adhèrent plus au capillaire, mais le flux de liquide à l'intérieur de ce celui-ci s'en trouve complètement modifié et devient alors totalement incontrôlable par le CellTram[®] Oil. Une solution possible serait d'utiliser un microinjecteur de type CellTram[®] vario possédant un incrément volumétrique plus faible et permettant donc un contrôle du flux de liquide à l'intérieur du capillaire plus précis. La technique de micromanipulation la plus adaptée à l'isolement des microorganismes filamenteux est celle utilisant la technique des "crochets" formés à partir de fines baguettes de verre et de microforges (Skerman, 1968; Tandoi *et al.*, 1994; Rossetti *et al.*, 1997).

Cette technique de microinjection est plus adaptée à l'isolement de microorganismes monocellulaires ou à de très courts filaments. Mais ils sont souvent situés au cœur des floes et

sont donc difficilement accessibles. Une déstructuration des floccs et des amas de particules permettrait d'identifier et d'isoler ces cellules de façon plus efficace. La déstructuration des floccs peut-être réalisée par traitement à l'Ultra-Turrax[®] ou par aspiration-refoulement à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de faible diamètre. Le traitement doit être modéré afin de ne pas générer un stress trop important pour les cellules ce qui pourrait entraîner une inhibition de leur croissance, voire leur mort. Une autre difficulté vient du fait qu'aucun marquage spécifique de la bactérie cible, en particulier un marquage FISH ne peut être réalisé sans provoquer la mort du microorganisme. Les critères morphologiques permettant de discriminer l'espèce bactérienne cible sont donc beaucoup plus restreints, et une multiplication des prélèvements est nécessaire.

1.2 Comportement morphologique de *Sphaerotilus natans* en fonction des conditions de culture

Dans un premier temps, le comportement morphologique des différentes souches de *Sphaerotilus natans* à notre disposition a été déterminé en fonction de deux facteurs conditionnant la croissance :

- ✓ L'état physique du milieu : matrice solide (gélose) ou liquide (bouillon)
- ✓ La concentration en nutriments du milieu

1.2.1 Différenciation morphologique en fonction de l'état physique du milieu : agar ou bouillon

Les bactéries présentant la caractéristique de pouvoir croître sous forme de filaments, et notamment *S. natans*, ne sont souvent retrouvées que sous cette forme dans les boues activées. La forme unicellulaire y est difficilement détectable. Cette morphologie pourrait donc être induite par l'état du milieu environnant, à savoir un milieu liquide. La croissance des différentes souches de collection de *Sphaerotilus natans* à notre disposition a été comparée pour un même milieu, sous forme de bouillon et de gélose.

1.2.1.1 Milieu CGYA

Les cultures ont été réalisées en injectant 500µL d'une culture de 16 heures préparée dans un Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de milieu CGYA. Elles sont placées sous agitation à

200 rpm et en étuve à 30°C. Lors d'une précédente étude (Gaval, 2001a), il a été démontré que l'absence d'agitation était un facteur inducteur de la filamentation. Ce phénomène a également été observé lors de ces travaux. L'agitation permet d'obtenir une aération plus homogène du milieu et *S. natans* étant une bactérie aérobique stricte, un déficit en oxygène du milieu va représenter pour le microorganisme un état de stress intense, conduisant à une croissance filamenteuse. Les observations microscopiques^f ont été réalisées au grossissement 500 (40X12,5) après 48 heures de culture (cf. Tableau 11).

Souches de <i>S. natans</i>	Gélose CGYA	Bouillon CGYA
13338T	Uniquement des cellules dispersées	Population hétérogène composée de longs filaments gainés, de filaments plus courts et d'amas de cellules dispersées
13929	Des cellules dispersées et quelques filaments gainés	Longs filaments gainés et quelques rares cellules dispersées
15291	Uniquement des cellules dispersées dont certaines sont regroupées en amas	Très longs filaments gainés, avec de très rares cellules dispersées
29329	Cellules dispersées et quelques très courts filaments	Majoritairement de courts filaments et des cellules dispersées (constituer d'environ 20 à 30 cellules)
29330	Uniquement des cellules dispersées	Cellules dispersées et courts filaments (constituer d'environ 20 à 30 cellules)

Tableau 11 : Morphologies observées pour les différentes souches de *S. natans* en gélose et bouillon CGYA.

1.2.1.2 Milieu NB à 0,5%

Les mêmes observations^g ont été réalisées avec le milieu NB à une concentration de 0,5% sous sa forme de bouillon et d'agar (cf. Tableau 12), dans des conditions identiques à celles décrites précédemment.

^f Les photographies des bactéries figurent dans l'annexe 1

^g Les photographies des bactéries figurent dans l'annexe 1

Souches de <i>S. natans</i>	Gélose NB à 0,5%	Bouillon NB à 0,5%
13338T	Cellules dispersées majoritaires et filaments très courts non gainés	Cellules dispersées et filament courts non gainés en proportion équivalente
13929	Cellules dispersées largement majoritaires et quelques courts filaments non gainés	Très longs filaments gainés et de très rares cellules dispersées
15291	Uniquement des cellules dispersées, pas de filament	Très longs filaments gainés et de très rares cellules dispersées
29329	Uniquement des cellules dispersées, pas de filament	Uniquement de courts filaments (d'une longueur équivalente à environ 20 cellules), pas de cellules dispersées
29330	Uniquement des cellules dispersées, pas de filament	Courts filament et cellules dispersées en proportion équivalente

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des morphologies observées pour les différentes souches de *S. natans* en gélose et bouillon NB à 0,5%.

De même que pour le milieu CGYA, la forme bouillon du milieu NB à 0,5% induit préférentiellement la croissance des souches de *S. natans* sous forme de filaments.

1.2.2 Orientation morphologique en fonction de la concentration en nutriments du milieu de culture

L'expérience consiste ici à faire varier uniquement la concentration en substrat du milieu. Le milieu utilisé est le milieu NB, et la concentration en nutriments est directement proportionnelle au pourcentage de NB lyophilisé dans la préparation du milieu. Les observations ont été effectuées après 48 heures de culture en milieu NB sous forme d'agarose et de bouillon.

La croissance des différentes souches de *S. natans* a été étudiée pour des concentrations en NB de 1, 0,5, 0,1 et 0,05%. Les cultures sont effectuées en étuve à 30°C, et sous agitation à 200 rpm, pour le bouillon NB.

Les morphologies adoptées en fonction de la concentration en nutriments du milieu sont représentées sous formes d'histogrammes qui correspondent pour chacune des souches à la proportion de filaments et de cellules dispersées. Les critères d'évaluation (cf. Tableau 13)

sont inspirés de ceux décrits par Jenkins *et al.* (1984) pour estimer la proportion de filaments en boues activées et qui ont été décrits dans la synthèse bibliographique de ce document.

Valeur numérique	Morphologie(s) observée(s)
1	Uniquement des cellules dispersées
2	Majoritairement des cellules dispersées
3	Autant de cellules dispersées que de filaments
4	Majoritairement des filaments
5	Uniquement des filaments

Tableau 13 : Évaluation numérique de la morphologie adoptée en fonction des conditions de culture.

- *S. natans* 13338T

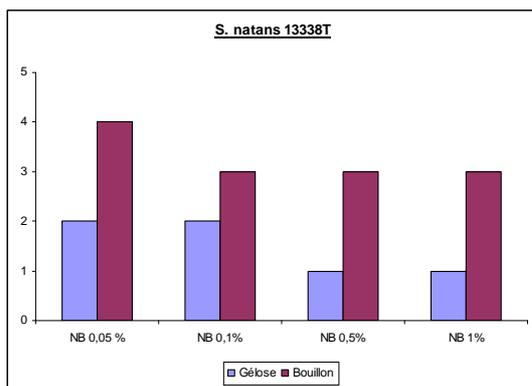


Figure 46 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 13338T en fonction de la concentration en substrat du milieu

Pour la souche *S. natans* 13338T, la morphologie varie peu dans la gamme de concentration en substrat testée. Dans tous les cas, la proportion de filaments est plus importante pour les cultures en milieu liquide que pour les cultures sur gélose. Cependant, la forme filamenteuse n'est majoritaire que lorsque la culture a lieu en milieu liquide et à la plus faible des concentrations en nutriments (0,05% de NB). Pour les autres concentrations la proportion de filaments est équivalente à celle des cellules dispersées.

Lors de la culture sur gélose, la forme dispersée est toujours majoritaire, et même exclusive à partir d'une concentration de 0,5% en NB.

- *S. natans* 13929

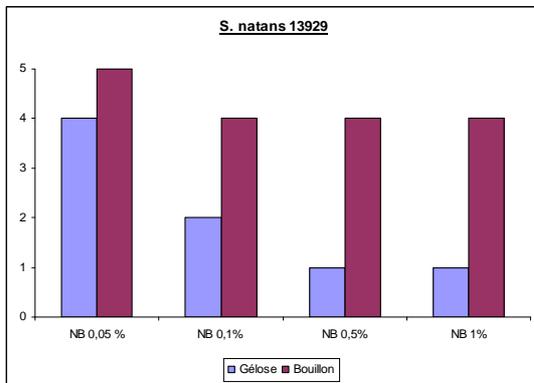


Figure 47 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 13929 en fonction de la concentration en substrat du milieu

La morphologie adoptée la souche *S. natans* 13929 lors de la culture en milieu liquide varie peu quelque soit la concentration en nutriments. On a toujours une croissance majoritairement filamenteuse.

Lors de la croissance sur gélose, contrairement à ce qui a été observé en bouillon, la morphologie adoptée par les microorganismes apparaît comme étant liée à la concentration en nutriments. Ainsi pour une concentration en milieu NB de 0,05%, la croissance se fait principalement sous forme de filaments, pour une concentration de 0,1% la proportion de filaments et de cellules dispersées est identique, et à partir de 0,5% de NB les bactéries se développent uniquement sous forme monocellulaire. Cette souche décrite comme ne se développant que sous forme de filaments (Gaval, 2001b), peut donc également adopter la morphologie dispersée si les conditions environnementales sont optimales.

- *S. natans* 15291

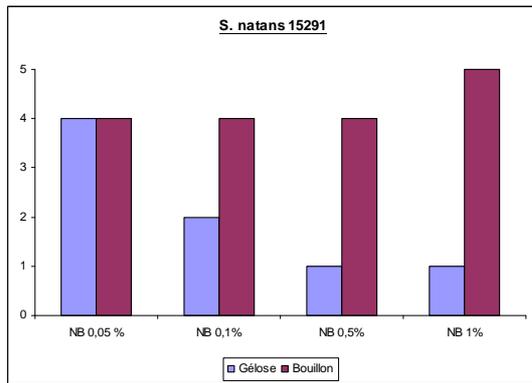


Figure 48 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 15291 en fonction de la concentration en substrat du milieu

La souche *S. natans* 15291 se comporte de façon similaire à la souche précédente. Lors de la culture sur gélose, plus la concentration en nutriment est faible, et plus la proportion de filaments est importante. Inversement, à partir d'une certaine concentration, 0,5% de milieu NB dans notre expérience, la croissance ne se fait plus que sous forme de cellules dispersées.

Lors de la croissance en bouillon, la morphologie adoptée varie très peu, et est majoritairement filamenteuse quelque soit la concentration en nutriments.

- *S. natans* 29329

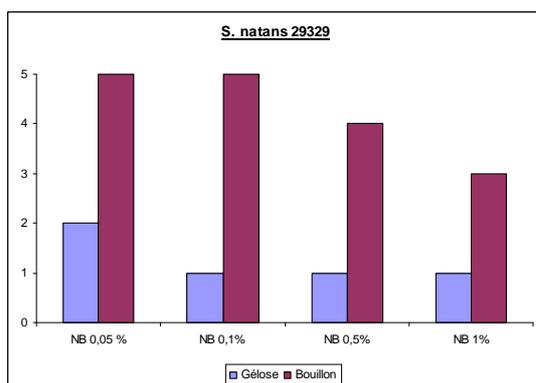


Figure 49 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 29329 en fonction de la concentration en substrat du milieu

Sur gélose, la croissance de *S. natans* se fait sous forme dispersée, seuls quelques filaments sont observés pour la concentration la plus faible en nutriments. La culture en bouillon oriente une nouvelle fois vers la croissance filamenteuse. Néanmoins, plus la concentration en

nutriments augmente dans le milieu, plus la proportion des effectifs monocellulaires augmente, mais sans jamais devenir majoritaires.

Il faut noter que les filaments formés par la souche *S. natans* 29329 ne sont jamais de très longs filaments comme ceux observés pour les souches 13338T, 13929 ou 15291. Ils ne dépassent pas 25 μm de long, ce qui correspond à environ 10 à 12 cellules.

- *S. natans* 29330

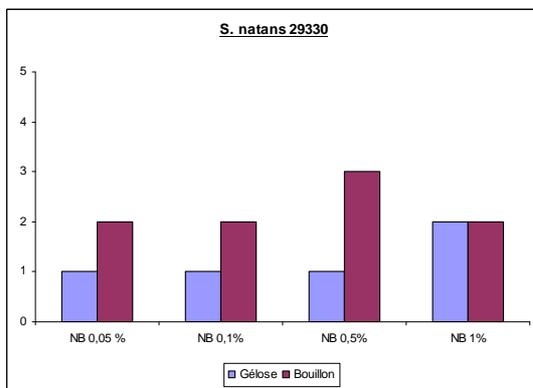


Figure 50 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 29330 en fonction de la concentration en substrat du milieu

La souche *S. natans* 29330 a un comportement unique parmi toutes les souches étudiées. En effet, elle a tendance à se développer préférentiellement sous sa forme dispersée, ceci aussi bien en milieu liquide, que sur gélose. Cette croissance essentiellement sous forme monocellulaire a lieu quelle que soit la concentration en nutriments, dans la limite où elle permet la survie des microorganismes.

Les filaments formés par la souche 29330 ont le même aspect que ceux de la souche 29329, c'est-à-dire de courts filaments (25 μm). Au cours de ces travaux, nous n'avons jamais observés de filaments plus longs pour ces deux souches.

1.2.3 Étude des transitions morphologiques pour différentes souches de *S. natans*

De précédents travaux ont montré que les changements de morphologie des différentes souches de la bactérie *S. natans* sont des phénomènes réversibles (Gaval, 2001b). Il est

également possible d'obtenir des bactéries sous forme dispersée à partir de filaments extraits de boues activées (Ramothokang *et al.*, 2006).

1.2.3.1 Transition cellules dispersées → filaments

L'aptitude des différentes souches à passer de l'état dispersée à l'état filamenteux est ici testée. Les différentes souches sont inoculées dans un milieu de culture inducteur de la filamentation (Takeda *et al.*, 2002b).

Composition du milieu inducteur de la filamentation :

- Protéose-peptone 0,2%
- Extrait de levure 0,02%
- MgSO₄ 0,02%

Au préalable, les différentes souches *S. natans* ont été cultivées sur gélose NB à 0,5% afin d'obtenir une population bactérienne exclusivement monocellulaire. Après 48 heures d'incubation à 30°C, les colonies présentes sur la boîte sont raclées puis remises en suspension dans du PBS stérile. Afin d'être certain que la suspension cellulaire ne contienne aucun filament, elle est passée à travers un filtre stérile Minisart® (Sartorius) à seringue possédant des pores de 5 µm, qui permet le passage des bactéries mais pas des filaments.

En fonction de la densité de la suspension cellulaire ainsi obtenue, 2 à 5 mL sont injectés dans 50 mL du milieu de filamentation, puis mis à incuber à 30°C et sous agitation pendant 48 heures. Les observations suivantes ont été effectuées au grossissement 500 et illustrent les morphologies adoptées par chaque souche après 48 heures de culture sur gélose NB 0,5% puis 48 heures après leur transfert dans le bouillon induisant la filamentation.

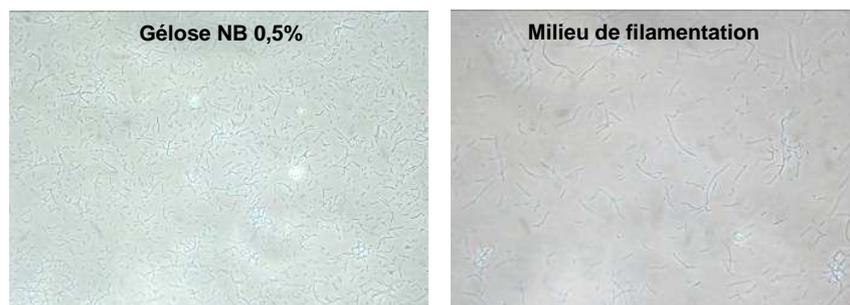


Figure 51 : Morphologies adoptées par la souche 13338^T (X 500).

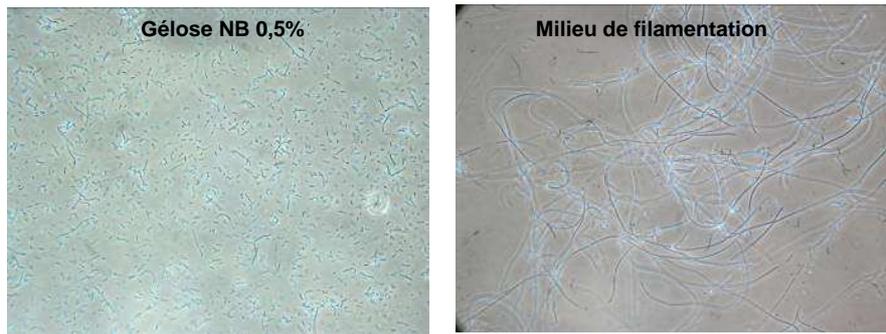


Figure 52 : Morphologies adoptées par la souche 13929 (X 500).

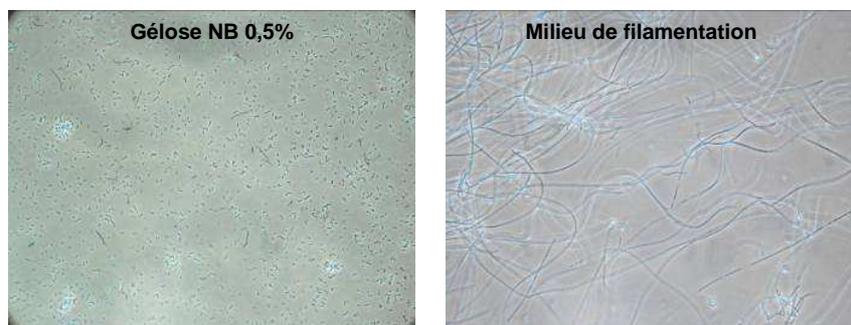


Figure 53 : Morphologies adoptées par la souche 15291 (X 500).

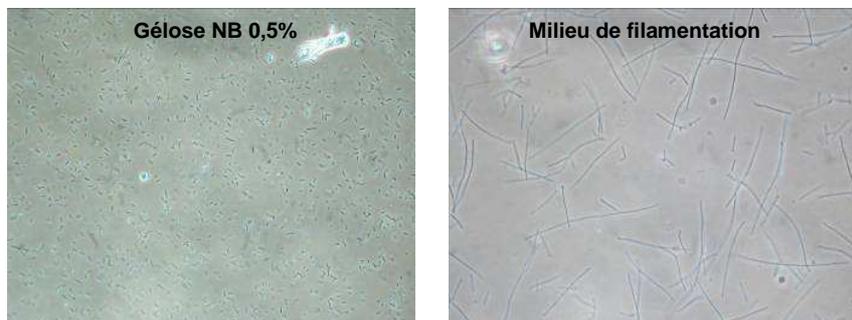


Figure 54 : Morphologies adoptées par la souche 29329 (X 500).

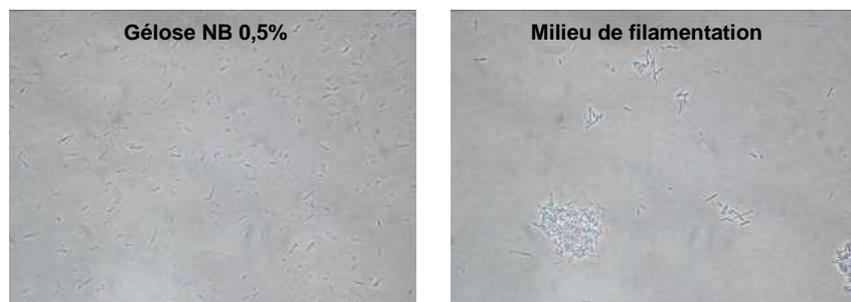


Figure 55 : Morphologies adoptées par la souche 29330 (X 500).

Dans tous les cas, à l'exception de la souche 29330 où l'on observe des cellules principalement dispersées et en amas, les bactéries se sont développées sous forme de filaments qui sont, à l'exception de la souche 29329, longs (plus de 100 μm) et gainés.

1.2.3.2 Transition filaments \rightarrow cellules dispersées

✓ *Transfert sur gélose*

L'aptitude des bactéries qui s'étaient développées sous forme de filaments à repasser à l'état de cellules dispersées est ici testée. Il a déjà été démontré, concernant les souches 13338T et 15291, que cela était possible en transférant les filaments obtenus après culture en bouillon CGYA sur une gélose PCA^h (Gaval, 2001b).

Dans cette expérience, les filaments obtenus après croissance en milieu de filamentation sont transférés sur gélose NB 0,5%. Dans tous les cas, après 48 heures de culture, une croissance importante sous forme de cellules dispersées est observée (cf. Figure 56).

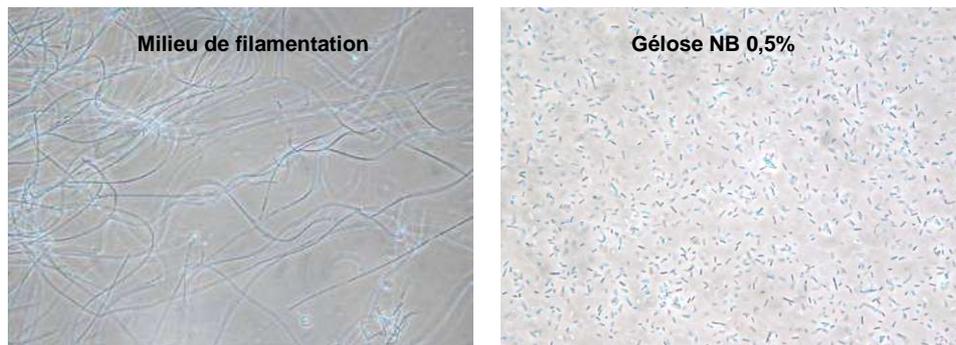


Figure 56: Observations réalisées pour la souche *S. natans* 15291 (X 500)

Ces résultats confirment donc la réversibilité du phénomène, à savoir que les bactéries ayant adoptées la croissance filamenteuse peuvent, sous l'influence d'un changement des conditions de cultures, repasser à une croissance sous forme de cellules dispersées.

^h La composition de la gélose PCA est donnée en annexe 2.

✓ *Transfert en bouillon*

Dans un second temps, la capacité des bactéries à repasser de l'état filamenteux à l'état dispersé en les transférant d'un bouillon de filamentation à un bouillon plus riche a été testée. Les filaments ont donc été transférés dans les milieux liquides suivants : NB 1% et CGYA.

- Culture en Erlenmeyer

Les cultures de filaments ont été réalisées dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL du milieu de culture, et placées à 30°C sous agitation (100 rpm) pendant 48 heures.

A l'exception de la souche 29330, pour laquelle la population est principalement composée de microorganismes monocellulaires, dans tous les autres cas elle reste majoritairement constituée de filaments (cf. Figure 57).

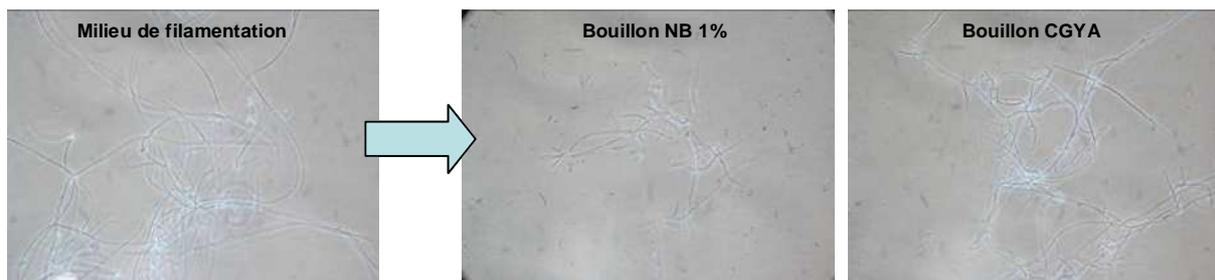


Figure 57 : Observations réalisées pour la souche *S. natans* 15291 (X 500)

- Culture en réacteur

Sphaerotilus natans étant une bactérie aérobie stricte, une des hypothèses qui pourrait expliquer sa croissance sous forme filamenteuse dans un milieu riche, (bouillons CGYA et NB 1%) serait une carence en oxygène. En effet, dans ce cas l'oxygène est apporté par échange entre la surface du liquide et l'air du récipient. L'agitation permet une meilleure diffusion de l'oxygène dans tout le liquide mais n'augmente pas l'apport proprement dit.

Des cultures ont donc été menées en réacteurs avec les bouillons NB 1% et CGYA. La description des réacteurs a été faite dans le chapitre précédent. Les cultures sont agitées à une vitesse de 300 rpm grâce à une hélice de type Ruchton, et un apport constant en oxygène est assuré par une insufflation d'air, filtré à 0,22 µm, directement dans le milieu. L'arrivée d'air se

situé au niveau de l'hélice, ce qui permet de casser les bulles d'air et d'assurer une meilleure diffusion de l'oxygène dans le milieu.

Les cultures en réacteur ont été faites avec les souches de *S. natans* 13338T (cf. Figure 58) et 15291 (cf. Figure 59). Les résultats sont similaires pour ces deux souches. 24 heures après l'inoculation de filaments, on observe dans le milieu des cellules dispersées mais également de nombreux filaments.

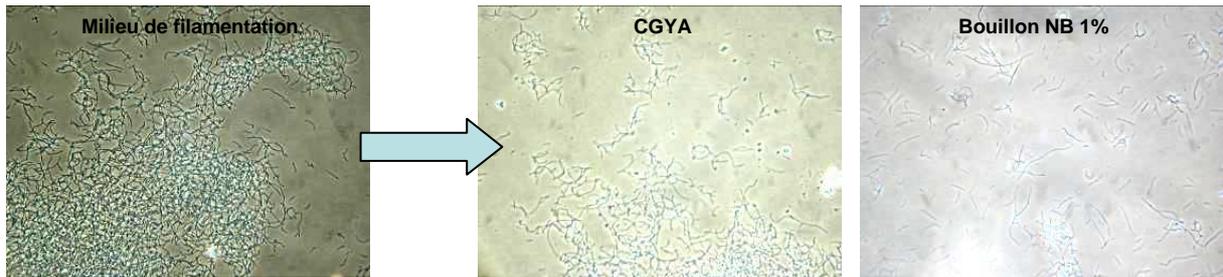


Figure 58 : Observations réalisées pour la souche 13338^T (X500).

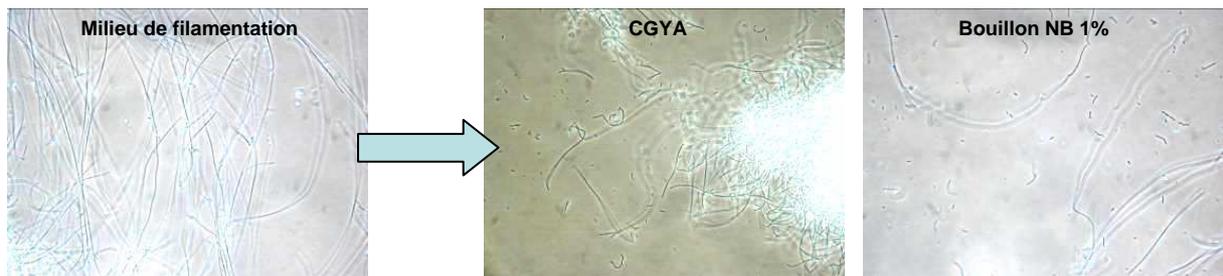


Figure 59 : Observations réalisées pour la souche 15291 (X500).

Il n'est donc pas possible dans ces conditions pourtant favorables, d'observer une disparition totale des filaments, au contraire ils ont continué à se développer simultanément à l'apparition de la forme dispersée de *S. natans*, et la quantité de filaments observée dans le réacteur après 24 heures est plus importante que celle introduite initialement.

1.2.4 Conclusions

Bien que les comportements des souches de *S. natans* soient relativement différents, il apparaît, de façon générale, que la culture en milieu liquide a tendance à induire la croissance sous forme de filaments. Plus que la nature même du milieu, il semblerait que le facteur influant sur la morphologie adoptée par *S. natans* soit l'accessibilité à l'oxygène (cf. Figure

60). On s'aperçoit en effet que le type de croissance du microorganisme suit un gradient d'oxygène. De manière générale, plus l'oxygène est facilement accessible et plus la bactérie va avoir tendance à adopter la forme monocellulaire, au contraire moins il est accessible pour la bactérie plus elle va avoir tendance à filamenter.



Figure 60 : Illustration du gradient de disponibilité de l'oxygène pour le microorganisme en fonction du type de milieu de culture.

Ces observations permettent également de mettre en lumière que les différentes souches de *S. natans* n'ont pas la même capacité à utiliser l'oxygène disponible. Ainsi certaines souches, comme la 13929, auront besoin d'une importante concentration en O_2 disponible pour pouvoir adopter la forme dispersée, alors que d'autres, comme la souche 29330, sauront utiliser de façon optimale le substrat et ainsi croître sous forme monocellulaire même dans un milieu plus pauvre en oxygène (cf. Figure 61).

À partir des observations effectuées, le comportement des différentes souches de *S. natans* en fonction de l'oxygène disponible dans le milieu de culture a été schématisé dans la figure 61.

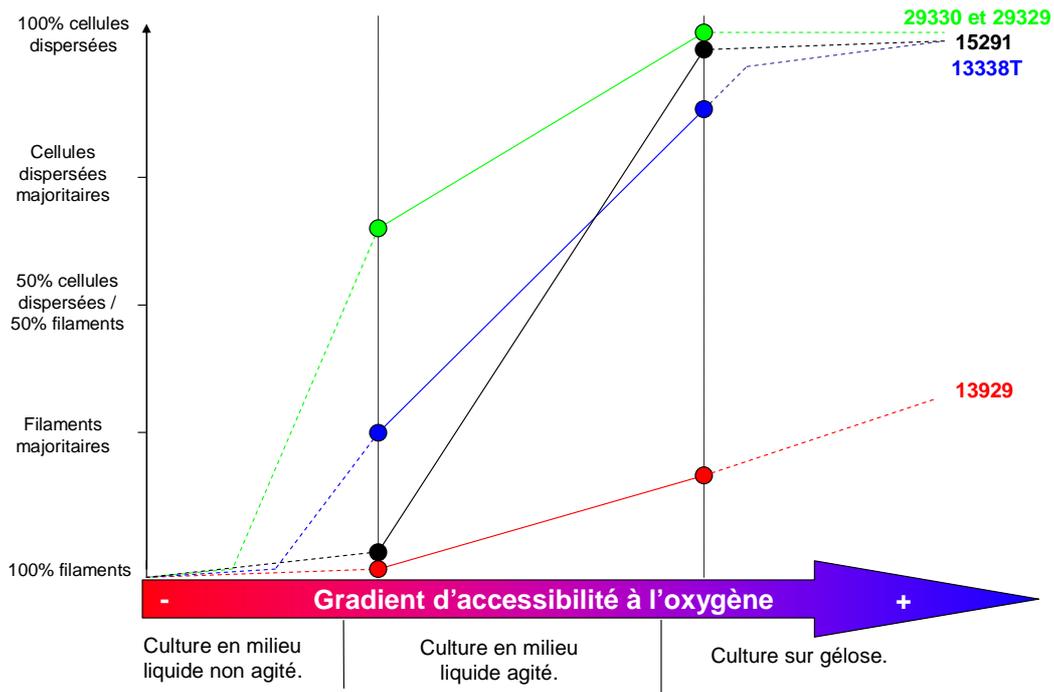


Figure 61 : Orientations morphologiques des différentes souches de *S. natans* (traits pleins) et évolutions théoriques (pointillés) en fonction du gradient d'oxygène.

Les portions de droite en pointillés ont été déduites à partir de données de travaux précédents (Gaval, 2001a) pour les souches 13338T, 13929 et 15291, et à partir de résultats obtenus au cours de cette étude et non présentés ici. Les points correspondent aux observations précédemment décrites dans cette étude. D'après les observations effectuées (cf. Figure 61), les différentes souches peuvent être séparées en 2 groupes en fonction de leur comportement face à la disponibilité de l'oxygène.

- Les souches pour lesquelles l'induction de la croissance sous forme monocellulaire nécessite peu d'oxygène : 29329 et 29330
- Les souches pour lesquelles l'induction de la croissance sous forme monocellulaire nécessite beaucoup d'oxygène : 13338T, 13929 et 15291

Afin de valider cette hypothèse, il pourrait être envisagé de réaliser des cultures de ces différentes souches en contrôlant précisément la concentration en oxygène dans le milieu. Il faudrait pour cela alimenter les réacteurs avec un mélange air/azote dont le ratio serait contrôlé. La proportion filaments/cellules dispersées pourrait ensuite être déterminée simplement. En filtrant une partie de la suspension cellulaire, la fraction filamenteuse retenue sur le tamis cellulaire, et la fraction monocellulaire du filtrat pourraient être rapidement

quantifiées par PCR quantitative en temps réel, et un ratio cellules dispersées/filaments pourrait ainsi être établi en fonction de la concentration précise en oxygène du milieu.

De même que pour l'impact de la concentration en oxygène du milieu, il apparaît que les souches de *S. natans* étudiées ont des comportements morphologiques très différents en fonction de la concentration en nutriments du milieu de culture. De façon générale, on observe qu'à de faibles concentrations, la plupart des souches adoptent une croissance filamenteuse, y compris pour les cultures sur gélose, mais de façon moins prononcée que pour les cultures en bouillon. À l'inverse, de fortes concentrations en substrat vont avoir tendance à orienter les bactéries vers une croissance sous forme dispersée. Pour les cultures en bouillon, une concentration importante en nutriment va permettre la croissance de bactéries sous forme dispersée. Néanmoins, la croissance sous forme de filaments est également présente, même si elle n'est plus majoritaire. Ceci vient probablement du fait que l'apport en oxygène lors d'une culture en milieu liquide est un facteur limitant comme cela a été vu précédemment. Ainsi même si la concentration en nutriments est suffisante, une croissance sous forme filamenteuse peut résulter d'un déficit en oxygène. Les différentes formes de croissance observées ne sont donc pas uniquement dues à la quantité de substrat disponible, mais résultent d'une combinaison de deux facteurs limitant : la concentration en nutriments et l'apport limité en oxygène. Les observations effectuées sur gélose sont donc beaucoup plus informatives quant au comportement des souches face aux variations de concentration en substrat, puisque dans ce cas l'apport en oxygène n'est pas un facteur limitant. Un graphique (cf. Figure 62) similaire au précédent a été établi en ce qui concerne l'impact de la concentration en nutriments.

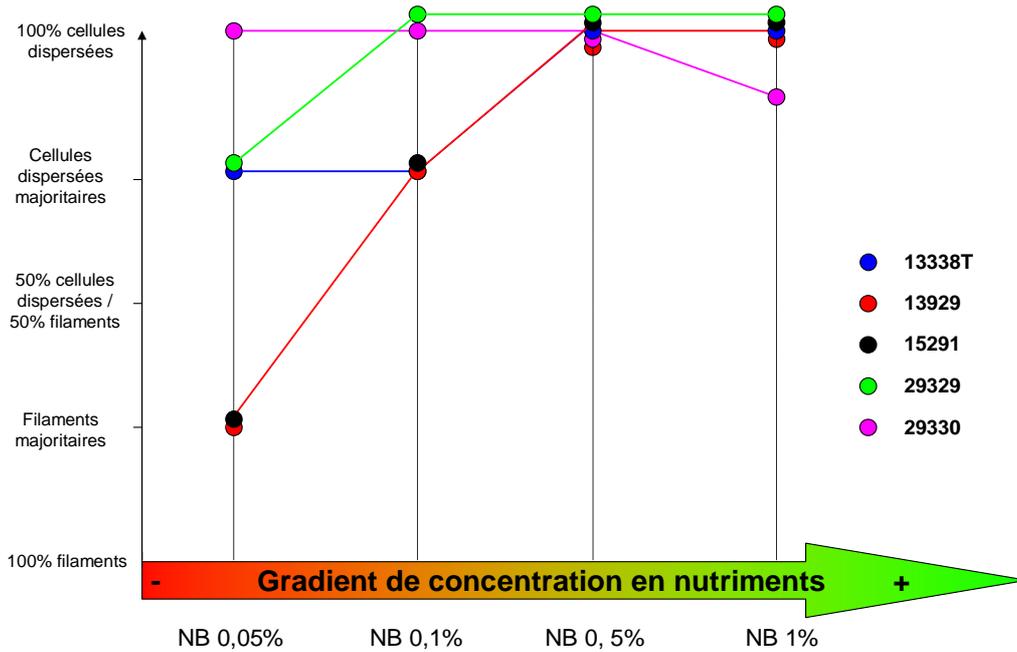


Figure 62 : Orientations morphologiques des différentes souches de *S. natans* en fonction de la concentration du milieu en nutriments. Cultures sur gélose.

Si toutes les souches se développent sous forme monocellulaire pour de fortes concentrations en nutriment (0,5 et 1% de NB), on observe pour des concentrations plus faibles des réponses morphologiques différentes permettant de distinguer trois groupes :

- Les souches 29329 et 29330 se développent quasiment exclusivement sous forme monocellulaire y compris pour de faibles concentrations en nutriments (milieu à 0,05% de NB)
- Les souches 13929 et 15291, pour de faibles concentrations en NB, se développent principalement sous forme de filaments, mais à partir d'une concentration de 0,5%, elles adoptent exclusivement la morphologie dispersée.
- La souche 13338T se situe entre ces deux groupes. Pour les différentes concentrations en NB testées, sa croissance se fait majoritairement sous forme dispersée avec toutefois la présence de quelques filaments pour les faibles concentrations en NB (0,05 et 0,1%) à la différence des souches 29329 et 29330.

D'après ces observations, il est possible de conclure que la concentration en nutriments dans le milieu influe directement sur la morphologie du microorganisme. Les faibles concentrations ont tendance à orienter vers la forme filamenteuse, alors que les fortes concentrations favorisent le développement des microorganismes monocellulaires. En ce qui

concerne l'espèce *S. natans*, il semblerait que le facteur primordial guidant la morphologie adoptée soit la concentration en oxygène disponible pour la bactérie. Cependant au sein d'une même espèce, les différentes souches n'ont pas toutes le même comportement vis-à-vis de cette variable. Il reste à déterminer les éléments expliquant une telle différence.

Il a été démontré que le passage d'une morphologie à l'autre est un phénomène réversible. Cependant, la transition vers la forme dispersée à partir de filaments est très difficile à obtenir en milieu liquide, et cela quelles que soient les conditions de cultures appliquées. Si l'apparition d'une forte population de cellules dispersées peut être observée lors du transfert dans un bouillon plus riche ou contenant plus d'oxygène, la forme filamenteuse continue néanmoins à se développer. Ceci est très probablement dû à une disponibilité de l'oxygène plus limitée en milieu liquide. Cependant, même sur gélose, où le passage de la forme filamenteuse à la forme dispersée est plus facilement et plus efficacement induit, les filaments présents initialement ne disparaissent pas totalement. Cela pourrait remettre partiellement en cause le phénomène de défilamentation dont l'existence avait été suggérée lors de précédents travaux sur *S. natans* (Gaval, 2001a). Il est très probable que ce phénomène ait lieu pour permettre à la bactérie de recoloniser le milieu sous forme monocellulaire une fois les conditions environnementales devenues plus favorables, mais seule une partie du trichome subirait ce phénomène afin de permettre la libération de quelques cellules.

1.3 Détermination du mode d'allongement des filaments de *S. natans*

Cette partie des travaux a pour objectif de déterminer le mode de formation des filaments. Deux hypothèses ont été formulées concernant leur mode d'allongement :

- ✓ Un chaînage de cellules dispersées, suivie de la formation d'une gaine polysaccharidique.
- ✓ Une série de divisions successives d'un individu et donc un allongement apical du filament.

Les observations (Figure 63 A et B) effectuées au sein du laboratoire ont montré des cellules dispersées s'agencant de façon à former une ébauche de filament dépourvu de gaine polysaccharidique et ont donc amenées à considérer avec attention la première hypothèse.

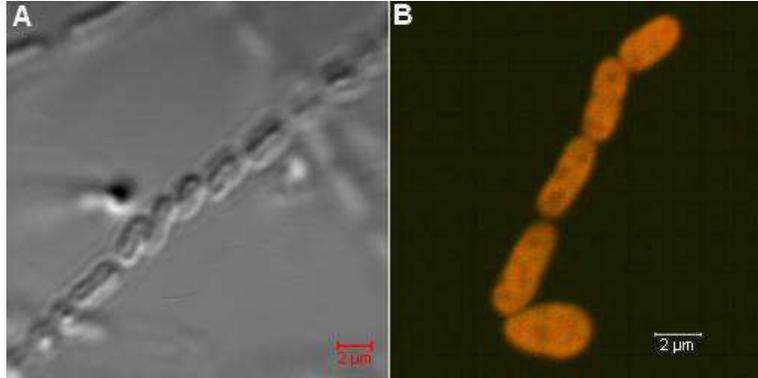


Figure 63: Observations réalisées en A) contraste d'interférence différentiel (DIC) et B) épifluorescence après marquage avec la sonde SNA.

1.3.1 Étude de l'évolution des classes de taille lors du phénomène de filamentation par cytométrie en flux

Lors de la croissance sous forme filamenteuse, les deux morphologies coexistent pendant un certain laps de temps. Selon le mode d'allongement, l'évolution des deux effectifs sera différente.

- Si l'allongement se fait par polymérisation de cellules isolées, les effectifs monocellulaires diminueront alors que le nombre de filaments augmentera, puis se stabilisera lorsque le stock de cellules isolées disponibles sera épuisé.
- Si l'allongement se fait par divisions successives des cellules, les effectifs monocellulaires diminueront ou resteront stables, en fonction du nombre de cellules impliquées dans la formation de filament, alors que les effectifs filamenteux augmenteront.

L'objectif a donc été de suivre l'évolution des effectifs de ces deux classes de tailles que sont les cellules dispersées et les filaments lors du processus de filamentation. La cytométrie

semble être la technique la plus adaptée puisqu'elle permet à la fois de quantifier et de déterminer de façon précise la taille des cellules. Un détecteur mesure la lumière diffractée en face de la source, fournissant ainsi un paramètre appelé FSC qui permet d'estimer la taille des éléments passant devant le laser.

Une suspension de la souche *S. natans* 15291 sous forme monocellulaire, obtenue comme décrit dans le paragraphe précédent, est transférée dans un Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL d'un milieu induisant la filamentation. Après inoculation, un prélèvement de 1 mL de culture est effectué toutes les heures. Les cellules sont marquées au cFDA puis analysées sur un cytomètre BactiFlow (Chemunex SA).

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes, avec en abscisses le paramètre FSC, qui correspond à la taille de l'événement coupant le laser, et en ordonnées les effectifs cellulaires correspondant à une taille donnée (cf. Figure 64). Dans les premiers temps, un unique pic correspondant à des cellules de petite taille apparaît. Ces cellules correspondent donc aux effectifs monocellulaires, puisqu'ils sont les seuls présents au temps initial du suivi. La population correspondante est regroupée dans une région de l'histogramme appelée RN1 (cf. Figure 64 A), et elle est exprimée en cellules.mL⁻¹ par le logiciel de traitement des données du cytomètre.

Au cours du temps une seconde population de taille plus importante apparaît clairement sur l'histogramme. Elle correspond à la population de la région nommée RN2 (cf. Figure 64 B).

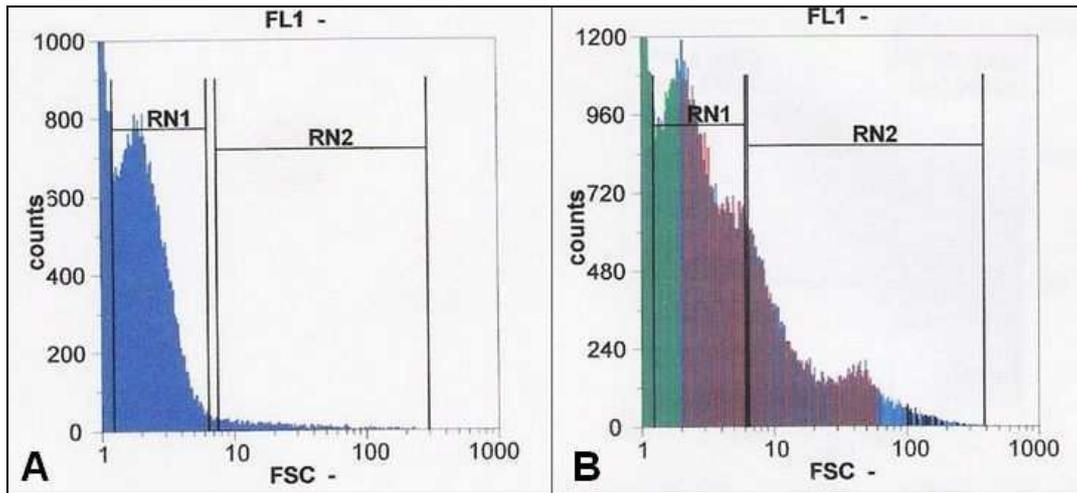


Figure 64 : Histogramme obtenu à A) T0 et B) T19 heures lors du suivi des différentes classes de taille au cours du phénomène de filamentation. La région RN1 correspond aux bactéries sous forme monocellulaire, et la région RN2 correspond aux éléments de taille plus importante, les filaments. L'axe des abscisses, FSC, correspond à la taille des événements passant devant le laser, en unité arbitraire. L'axe des ordonnées correspond au nombre d'événements d'une taille précise passant devant le laser durant la durée du comptage.

La cinétique d'évolution des populations sous forme dispersée et sous forme filamenteuse au cours des 19 premières heures du processus de filamentation a également été déterminée (cf. Figure 65).

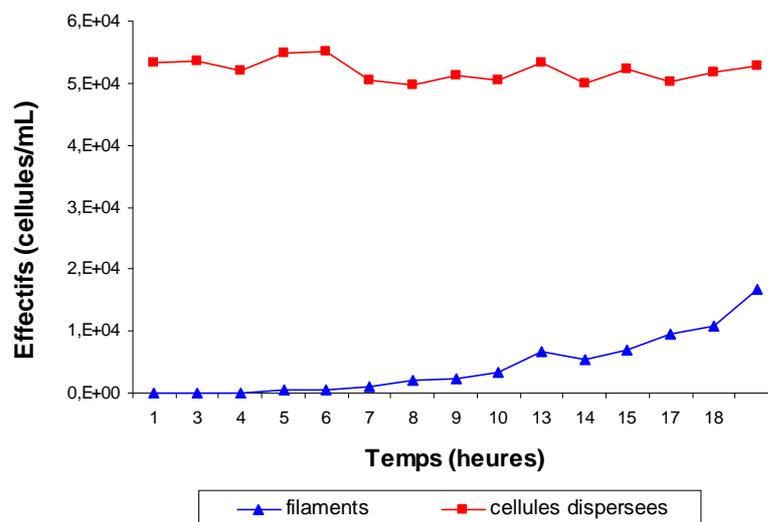


Figure 65 : Évolution des populations monocellulaires (courbe rouge) et filamenteuses (courbe bleue) au cours du processus de filamentation de la souche *S. natans* 15291.

Ces données (cf. Figures 64 et 65) permettent de voir que lors de l'induction de la filamentation, la population de bactéries sous forme monocellulaire reste stable lors des 19 premières heures. En effet, les effectifs sont d'environ 53 000 cellules.mL⁻¹ à T0, et un peu plus de 52 000, 19 heures après l'induction de la filamentation. Au cours de ce laps de temps les différentes mesures restent comprises entre 50 000 et 55 000 cellule.mL⁻¹.

Dans le même temps, la population de taille plus importante correspondant aux filaments augmente de manière significative, passant d'un effectif nul à T0, à près de 17 000 individus par mL. Il faut noter que ces chiffres sous-estiment grandement les effectifs en raison d'un filtrage de la culture avant analyse en cytométrie. De plus la taille du canal par lequel passe la suspension cellulaire à analyser est de 50 µm de diamètre, ce qui représente donc la taille maximale des particules pouvant être étudiées. Les filaments de *S. natans* 15291 pouvant atteindre des longueurs largement supérieures, les prélèvements sont passés sur un tamis cellulaire, possédant des mailles de 40 µm, avant le marquage au cFDA. Des observations microscopiques ont mis en évidence qu'à partir de la 12^{ème} heure, de nombreux filaments longs sont retenus sur le filtre, et que leur nombre augmente encore au cours du temps.

Ces différents résultats tendent vers l'hypothèse selon laquelle la croissance des filaments serait due à des épisodes de divisions successives et incomplètes de certaines cellules. En effet, en cas de chaînage des bactéries dispersées, une diminution de cette population devrait accompagner l'augmentation de la population filamenteuse. Le fait que les effectifs dispersés restent stables pourrait signifier que seule une partie de cette population serait impliquée dans la formation de filaments. Cependant, rien ne permet d'exclure totalement l'hypothèse d'un chaînage de cellules car, la stabilité des effectifs monocellulaires pourrait résulter d'un renouvellement constant permettant la construction des filaments. Cette hypothèse semble toutefois beaucoup moins probable puisque ce mode de fonctionnement aurait un coup énergétique élevé, alors que les microorganismes sont ici en situation de stress.

Afin de conclure sur le mode de formation des filaments, nous avons testé la capacité des cellules à former des filaments en conditions inhibitrices de la division cellulaire. Deux stratégies ont été employées pour cela : la culture dans un milieu carencé en azote, et l'utilisation d'un antibiotique bloquant la division cellulaire.

1.3.2 Effet de l'inhibition de la division cellulaire par une carence en azote

Dans cette expérience, le milieu de culture utilisé est dérivé du milieu inducteur de la filamentation (Takeda *et al.*, 2002b) et dans lequel les sources d'azote ont été supprimées. Les microorganismes disposent de glucose comme source de carbone et de sucre pour la synthèse de la gaine polysaccharidique.

Composition du milieu inducteur de la filamentation carencé en azote :

- Glucose 0,6%
- MgSO₄ 0,03%
- CaCO₃ 0,02%

La suspension de cellules dispersées de la souche *S. natans* 15291 a été préparée comme décrit précédemment. 2 mL de cette suspension cellulaire ont été inoculés dans 50 mL de milieu carencé en azote, puis incubé 48 heures à 30°C et sous agitation.

Avant d'être inoculée, la suspension cellulaire est marquée au cFDA/SE, afin de vérifier d'une part la viabilité des cellules, et d'autre part s'il y a ou non division cellulaire ce qui entraînerait une dilution de la fluorescence intracellulaire.

1.3.2.1 Croissance après 48 heures sans azote

Des observations effectuées immédiatement après filtration et avant l'inoculation des bactéries, permettent de vérifier que l'on a effectivement une population composée uniquement de cellules dispersées. Les microorganismes sont tous marqués avec la même intensité de fluorescence (cf. Figure 66).

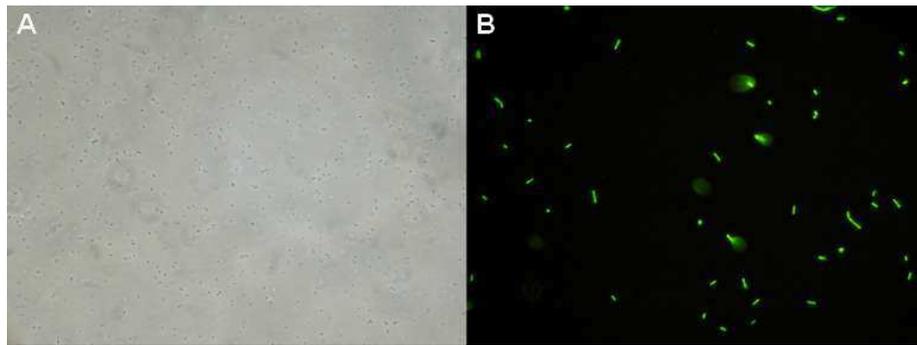


Figure 66 : Observations microscopiques de *Sphaerotilus natans* 15291 A) après filtration à 5 μ m et immédiatement avant inoculation dans le milieu carencé en azote (X 500), B) après marquage au cFDA/SE et immédiatement après inoculation dans le milieu carencé en azote.

Après 48 heures d'incubation à 30°C et sous agitation, les observations du marquage cFDA/SE par épifluorescence permettent de mettre en évidence qu'il n'y a eu aucune division cellulaire au cours de la culture. En effet, l'intensité de fluorescence des cellules marquées au cFDA/SE est identique à celle observée au moment de l'inoculation des bactéries.

Aucun long filament n'apparaît dans le milieu après 48 heures. En revanche, de très courts filaments, composé de 3 à 4 cellules, et sans gaine sont observés (cf. Figure 67). Les cellules ayant une forte tendance à se regrouper en amas, ces courts filaments pourraient n'être que des juxtapositions de cellules dispersées, ou bien un stade très précoce de la filamentation, ce qui expliquerait l'absence de gaine.

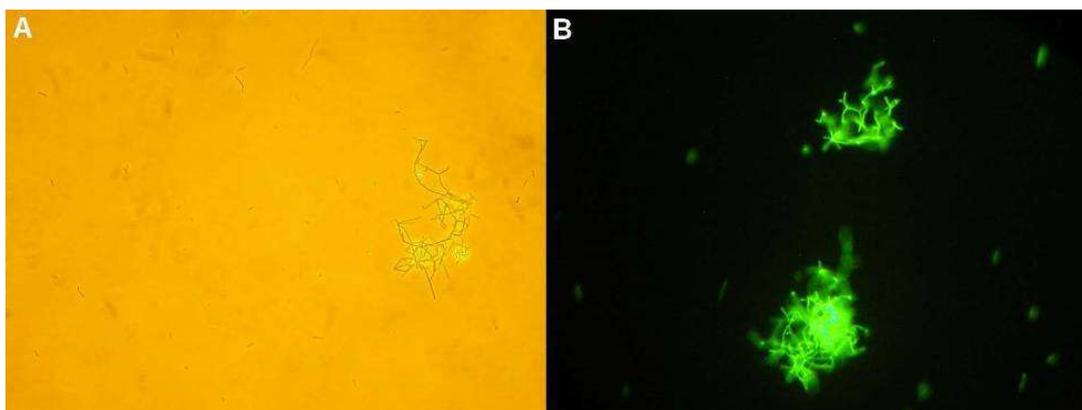


Figure 67 : Observations microscopiques de la souche *S. natans* 15291 après 48 heures de culture en milieu carencé en azote A) en contraste de phase et B) en épifluorescence par visualisation du marquage au cFDA/SE au grossissement 750.

1.3.2.2 Croissance après ajout d'une source d'azote

La même expérience est réalisée, mais cette fois une solution contenant de l'azote a été ajoutée après 48 heures de culture. Cette solution est composée d'extraits de levure et de Protéose-Peptide.

Composition de la solution source en azote :

- Extraits de levure 0,2%
- Protéose-peptide 2%

Après 48 heures de culture, 5 mL de cette solution sont ajoutés aux 50 mL de milieu carencé en azote. La culture est à nouveau incubée à 30°C et sous agitation pendant 48 heures. À l'issue de cette nouvelle période d'incubation, on observe une importante augmentation de la biomasse qui se développe sous forme de flocons dans le milieu (cf. Figure 68 A). On observe également une adhérence de biomasse sur la paroi de l'Erlenmeyer, au niveau de la surface du milieu de culture. L'observation de l'un de ces flocons au microscope à un faible grossissement (X100), fait apparaître un amas de filaments (cf. Figure 68 B).

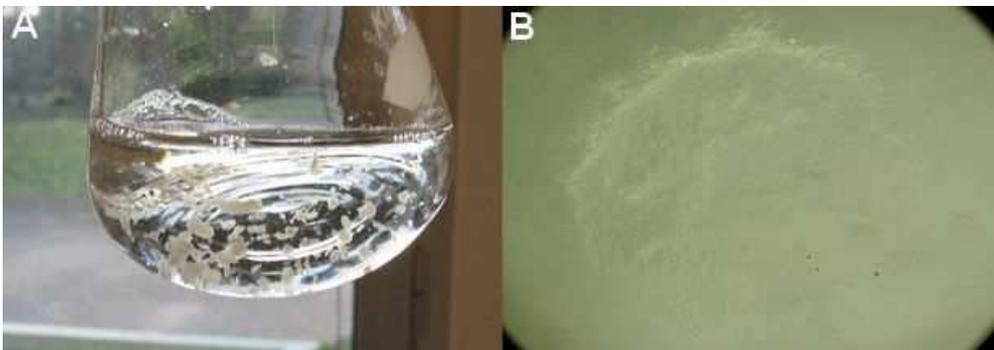


Figure 68 : A) observation de l'aspect macroscopique d'une culture de *S. natans* 15291 48 heures après l'ajout d'une solution source d'azote dans le milieu inducteur de filamentation. B) Observation microscopique d'un des flocons de la culture, grossissement 125.

Lors de l'observation microscopique (cf. Figure 69), il apparaît que les microorganismes se sont développés exclusivement sous forme de filaments. Lors de l'observation en épifluorescence, on observe quelques bactéries dispersées, noyées au milieu d'amas de filaments, qui eux ne présentent aucune trace de fluorescence. Ces quelques cellules fluorescentes sont donc soit intégrées dans les filaments, soit noyées dans la biomasse. La

densité de la population ne permet pas une analyse plus précise de l'image, ni de déterminer l'implication ou non dans la structure des filaments de ces microorganismes fluorescents, et n'ayant pas subi de division cellulaire.

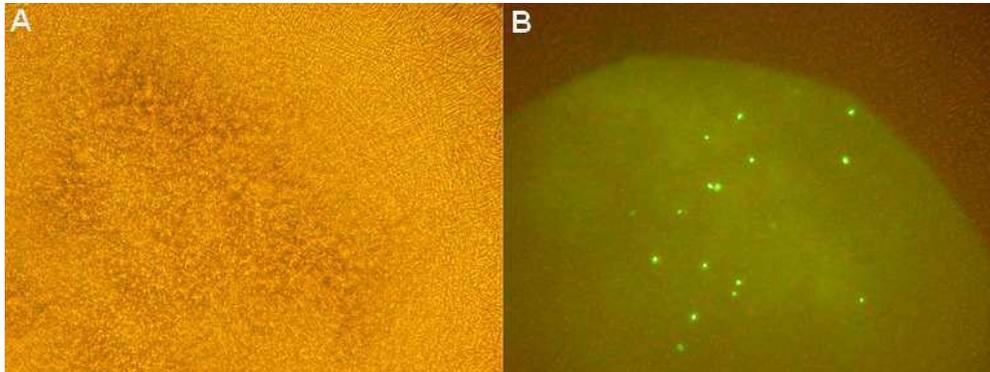


Figure 69 : Observations microscopiques d'une culture de *S. natans* 15291 48 heures après l'ajout de la solution source d'azote. Observation A) en contraste de phase et B) en épifluorescence du même champ d'observation, au grossissement 500.

Il est cependant important de noter que la solution ajoutée et apportant l'azote nécessaire à la division cellulaire, fournit également une source de vitamine et de facteurs de croissance grâce aux extraits de levure. Il pourrait être intéressant de réitérer cette expérience soit en apportant dès le départ une source de vitamines dans un milieu carencé en azote, soit en rajoutant une solution contenant uniquement une source d'azote, en injectant par exemple une solution de NH_3 . Ceci permettrait de définir si l'absence d'azote est bien inhibitrice de la filamentation. Une observation microscopique sur de plus courtes périodes pourrait être également réalisée, en observant par exemple la suspension cellulaire toutes les heures après ajout d'azote. Ceci pourrait permettre de mettre en évidence la dilution du signal fluorescent accompagnant la reprise de la division cellulaire.

D'après ces résultats, lorsque les bactéries, initialement à l'état dispersé, ne peuvent se diviser, la formation des filaments est impossible. Lorsque la division cellulaire est inhibée, les microorganismes seraient donc incapables de se regrouper et de former un filament entouré d'une gaine, même en présence d'une source de sucre, élément indispensable à la synthèse du polysaccharide. Cependant, une carence en azote, inhibe non seulement la division cellulaire, mais entraîne également un défaut de synthèse protéique. En effet, les protéines jouent un rôle important à travers les activités enzymatiques impliquées dans la synthèse de la gaine, mais elles entrent également dans sa composition à hauteur de 27%.

Dans ce cas, nous devons tenir compte du fait que l'absence de filamentation pourrait être due à un défaut de la synthèse protéique ou d'acides aminés.

1.3.3 Croissance en présence d'un inhibiteur spécifique de la division cellulaire : l'acide nalidixique

Afin d'inhiber la division cellulaire sans pour autant altérer la synthèse protéique, un antibiotique a été utilisé : l'acide nalidixique. Cette molécule appartient à la classe des quinolones qui inhibent le métabolisme des acides nucléiques, et en particulier la réplication de l'ADN (Crumplin & Smith, 1976; Hawkey, 2003). Elle a pour effet de bloquer la division cellulaire en agissant au niveau des topo-isomérases II et IV, et de désorganiser la réplication du chromosome bactérien (Chen *et al.*, 1996). En s'associant au complexe formé par l'ADN et la topo-isomérase II, ou gyrase, cet antibiotique peut même entraîner l'induction du système SOS (Phillips *et al.*, 1987), aboutissant à des cassures de l'ADN et à la mort de la bactérie (cf. Figure 70).

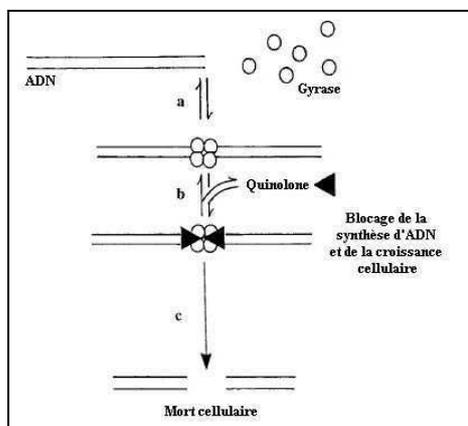


Figure 70 : Représentation schématique des événements impliqués dans la mort cellulaire induite par l'action des quinolones. a) l'interaction entre les ADN gyrases (complexe formé par les gyrases et topo-isomérases IV) et l'ADN permet un surenroulement négatif de l'ADN, nécessaire au processus de réplication. A ce moment les brins d'ADN sont cassés mais leurs extrémités sont maintenues grâce à l'action des ADN gyrases. c) Les quinolones vont empêcher la ligation des brins d'ADN coupés, c) et conduire à la dissociation du complexe ADN-Gyrase et au relargage de molécules d'ADN cassées conduisant à la mort des cellules.

Employée à doses modérées, cette molécule n'est pas létale mais inhibe la réplication de l'ADN, et donc la division cellulaire, sans provoquer de cassure irréversible de l'ADN. Et la synthèse protéique n'est pas ou peu altérée. Dans certains cas, l'acide nalidixique peut provoquer un allongement des cellules (Kogure *et al.*, 1979).

La croissance des bactéries dans le milieu inducteur de la filamentation auquel a été ajouté de l'acide nalidixique à une concentration de 20 mg.L^{-1} a été suivie (cf. Figure 71).

Les bactéries filtrées à $5 \mu\text{m}$ et marquées au cFDA/SE, sont inoculées dans ce milieu, puis incubées à 30°C et sous agitation (200 rpm).

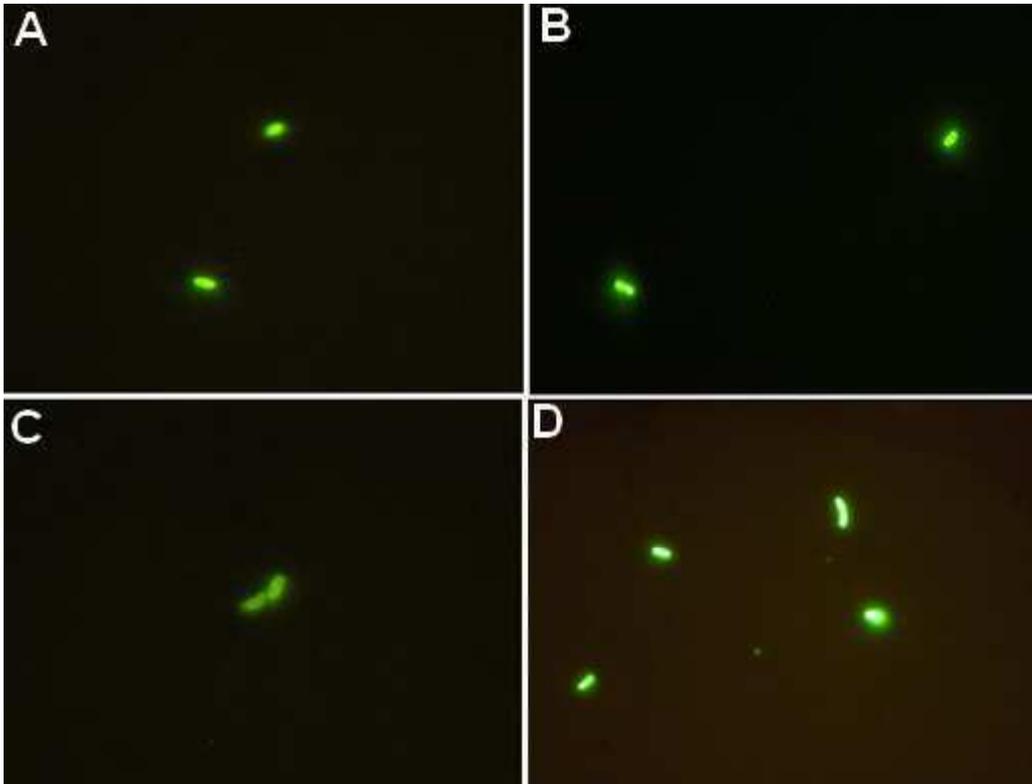


Figure 71 : Observations microscopiques au grossissement 750 de la souche *S. natans* 15291 lors de sa culture en milieu inducteur de la filamentation en présence d'acide nalidixique à 20 mg.L^{-1} et après marquage au cFDA/SE. Observations A) et B) immédiatement après inoculation des bactéries, C) et D) après 48 heures d'incubation à 30°C et sous agitation.

Les cellules ont une intensité de fluorescence identique à celle observée 48 heures plus tôt, ce qui confirme qu'elles ne se sont pas divisées (cf. Figure 71). Aucun filament n'est observé dans la culture. Quelques amas de cellules sont observables.

Les cellules sont de taille légèrement plus importante après 48 heures de culture que lors de l'observation initiale. Ceci est en accord avec des observations précédemment effectuées. Cependant, le fort allongement des cellules rapporté par la littérature lorsque l'acide nalidixique est appliqué à des bactéries Gram-négatives, n'est pas clairement observé dans ce cas.

1.3.4 Conclusion

Deux hypothèses ont été initialement formulées au sujet de la formation des filaments : un chaînage de microorganismes dispersés, ou un allongement apical des filaments par divisions cellulaires successives.

Il a été montré qu'un déficit en sources azotées dans le milieu de culture, synonyme d'inhibition de la division cellulaire, entraîne une incapacité de la bactérie *S. natans* à former des filaments. Cette observation va donc dans le sens de l'hypothèse selon laquelle le filament serait issu d'un microorganisme ayant subi une succession de divisions cellulaires.

Cependant, une carence en azote entraîne également un déficit de la synthèse protéique chez les microorganismes, qui pourrait empêcher les bactéries de synthétiser les polysaccharides et enzymes nécessaires à la structuration du filament et de la gaine. C'est pourquoi la croissance de *S. natans* dans un milieu inducteur de la filamentation en présence d'un antibiotique ayant la capacité de bloquer la division cellulaire, sans pour autant inhiber la synthèse protéique, a également été étudiée. Dans ces conditions, les microorganismes se montrent une nouvelle fois incapables de former des filaments. Ceci permet donc de conclure que la division cellulaire est un phénomène indispensable à la formation des filaments et que les cellules dispersées, ne sont en aucun cas capables de former une telle structure uniquement en se rassemblant.

En situation critique (carence en azote), il a été observé que les microorganismes ont tendance à se regrouper. Cette agrégation pourrait être une réponse des bactéries face à une situation de stress, mais elle pourrait également être une étape initiatrice de la formation des filaments. Ceci pourrait expliquer les observations précédentes. De même, la sécrétion d'une importante quantité d'exopolysaccharides par les cellules dispersées pourrait jouer le rôle de liant entre les individus lors de cette étape de regroupement. En effet la composition de cet exopolysaccharide serait, d'après la littérature (Takeda *et al.*, 2002c) très différente de celle du polysaccharide constituant la gaine entourant le filament (Takeda *et al.*, 1998). Ceci exclue donc que l'EPS soit un précurseur du polysaccharide de la gaine.

Ce tropisme apical qui semble ressortir des observations effectuées dans le cadre de cette étude pourrait également être le résultat de l'expression par les bactéries, lors d'une exposition à une situation de stress, de molécules de reconnaissance ou d'adhésion, de type sélectine ou CAM (Cell Adhesion Molecules) par exemple. *Pseudomonas aeruginosa* synthétise dans certaines situations des molécules d'acylhomosérine lactone (AHL) (Quorum sensing) qui diffusent de bactéries à bactéries permettant ainsi d'activer et de synchroniser la virulence pour l'ensemble de la population bactérienne (Passador *et al.*, 1993; Ruimy & Andremont, 2004). De la même façon, il pourrait exister des molécules synthétisées par les cellules dispersées de *S. natans* lors d'une situation de stress et les incitant à se regrouper et activant la transcription de gènes initiateurs de la filamentation.

Ce regroupement des bactéries pourrait donc être une étape initiatrice de la croissance filamenteuse. Ce phénomène d'adhérence cellulaire devrait également être retrouvé au niveau des bactéries filamenteuses non-gainées, qui ne possèdent donc pas de structure physique assurant leur cohésion sous forme de filament.

Ces différentes observations permettent d'émettre l'hypothèse que le processus de formation du filament (cf. Figure 72) se déroulerait de la manière suivante :

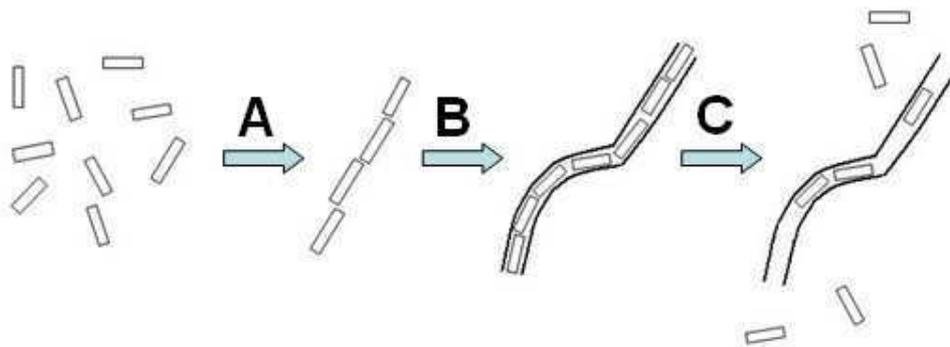


Figure 72 : Schémat des processus hypothétiques de filamentation (A et B) et de défilamentation (C).

- A - Sous l'influence de divers facteurs des cellules initialement dispersées auraient tendance à se regrouper et à se juxtaposer au niveau de leurs extrémités, aboutissant à la formation d'un filament court et dépourvu de gaine, que l'on pourrait qualifier de protofilament.

- B - Le protofilament synthétise une gaine polysaccharidique qui l'entoure, et s'allonge simultanément par divisions successives des cellules, atteignant une taille pouvant aller jusqu'à 500 μm .
- C - En cas de retour à une situation plus favorable, les bactéries vont avoir tendance à s'extraire du filament et les microorganismes monocellulaires vont recoloniser le milieu. Ce phénomène ne nécessite peut-être pas une lyse intégrale de la gaine, comme le laisse supposer l'observation de gaines vides ou partiellement occupées par des cellules (cf. Figure 73). Ceci impliquerait une désolidarisation des cellules et du polysaccharide de gaine ainsi qu'une mobilité des cellules à l'intérieur du filament.



Figure 73 : Observation microscopique de filaments et de gaines présentant des espaces dépourvus de cellules dans une culture *S. natans* 15291.

Il reste à identifier les différentes enzymes et molécules intervenant dans ce mécanisme. La mise en évidence de l'expression de molécules d'adhésion, ou autres facteurs permettant aux cellules de se regrouper lors du stade précoce de la filamentation, permettrait de confirmer que ce processus résulte bien d'un rassemblement de bactéries dispersées, suivi par des divisions cellulaires successives.

1.4 Étude du gène *sthA*

Comme nous l'avons vu précédemment dans la synthèse bibliographique, le gène *sthA* (Suzuki *et al.*, 2002) est à l'heure actuelle le seul connu comme étant directement impliqué dans le mécanisme de filamentation chez *Sphaerotilus natans*, mais également dans tout le règne bactérien. La protéine pour laquelle code ce gène n'a pas encore été identifiée, même si sa séquence nucléotidique laisse supposer qu'il s'agit d'une enzyme de type glycosyltransférase. De précédents travaux basés sur la RT-QPCR (Suzuki *et al.*, 2002), ont conclu que l'expression du gène *sthA* ne variait pas, que la bactérie *S. natans* 15291 soit sous forme dispersée ou filamenteuse. Ce résultat peut sembler étonnant concernant un gène apparemment essentiel dans le mécanisme de filamentation. Cela impliquerait que ce gène n'est pas régulateur et qu'il doit donc être coexprimé avec d'autres gènes pour induire cette forme de croissance. Cependant, la méthodologie employée par ces auteurs pour l'étude de l'expression du gène *sthA* peut prêter à discussion. Ces éléments nous ont donc conduit à étudier plus précisément l'expression de ce gène en fonction de la morphologie adoptée par la bactérie.

1.4.1 Création d'amorces spécifique du gène *sthA*

1.4.1.1 Test des amorces *sthA* définies par Suzuki *et al.* (2002)

Comme cela a déjà été dit dans le chapitre Matériels et Méthodes, les amorces utilisées par Suzuki *et al.* (2002) ne semblent pas vraiment adaptées pour une utilisation en QPCR. En effet, le produit d'amplification obtenu a une taille d'environ 880 paires de bases, alors que la taille généralement préconisée est comprise entre 80 et 200 paires de bases, la taille optimale étant comprise entre 100 et 150, que l'on travaille avec la chimie SYBR Green ou Taqman. De plus, l'utilisation d'amorces aboutissant à la formation d'un amplicon de plus de 300 paires de bases est fortement déconseillée. En effet, la synthèse d'un produit d'amplification de grande taille va consommer plus de réactifs, notamment des dNTPs. Ceci va conduire à un appauvrissement prématuré en réactifs, aboutissant à une diminution de la durée de la phase exponentielle d'amplification, voire même à ne jamais atteindre cette phase exponentielle.

L'efficacité des amorces *sthAFOR* et *sthAREV* décrite par Suzuki *et al.* (2002) pour l'étude de l'expression du gène *sthA* a été vérifiée. La séquence des amorces est indiquée dans le chapitre Matériels et Méthodes (Tableau 6, page 110), et leur position sur la séquence du gène est

indiquée dans l'annexe 3. Elles ont été testées en reprenant exactement les conditions décrites par les auteurs, sur les ADN des cinq souches de collections de *S. natans*.

Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant le profil d'amplification suivant (cf. Tableau 14), identique à celui décrit par les auteurs, mais prolongé par une étape d'extension finale.

Activation de la Taq polymérase	95°C	10 minutes	
	94°C	15 secondes	
Amplification du fragment du gène <i>sthA</i>	60°C	30 secondes	40 cycles
	72°C	40 secondes	
Extension finale	72°C	5 minutes	

Tableau 14 : Profil d'amplification (Suzuki et al., 2002) utilisé pour les amorces *sthA*FOR et *sthA*REV.

Dans ces conditions, aucune amplification du gène *sthA* n'a pu être obtenue pour chacune des cinq souches de collections de *S. natans*, ainsi que pour la souche isolée par micromanipulation à partir de boues activées, Roxane.

Des essais d'optimisation des conditions de PCR pour ce couple d'amorces ont été effectués en faisant varier deux facteurs :

- La concentration finale en MgCl₂ : 0,5 à 1,5 mM
- La température d'hybridation : de 55 à 62°C

Malgré ces tentatives d'ajustements et d'optimisation de la réaction, aucune amplification du fragment d'ADN attendu n'a pu être obtenue avec les amorces décrites par Suzuki et al. (2002). Dans ces conditions, il a donc été décidé de créer de nouvelles amorces pour le gène *sthA*.

1.4.1.2 Amorces *sthA* FP et *sthA* RP

1.4.1.2.1 Création des amorces *sthA* FP et *sthA* RP

Les amorces ont été créées en utilisant le logiciel en ligne Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), en se basant sur la séquence du gène *sthA* de la souche *S. natans* 15291, dont le numéro d'accès dans la base du NCBI est

AB050638. Les caractéristiques imposées au logiciel pour la création de ces amorces sont les suivantes :

- Longueur des amorces de 20 bases
- Température d'hybridation de 60°C, avec une tolérance de plus ou moins 1,5°C
- Taille du produit d'amplification comprise entre 120 et 200 paires de bases
- Impossibilité pour les amorces de former des dimères ou des structures secondaires en épingle à cheveux

Plusieurs couples d'amorces sont déterminés par le logiciel, et un couple est retenu pour l'étude. Les amorces sont baptisées *sthA* FP pour l'amorce sens, et *sthA* RP pour l'amorce anti-sens (cf. Tableau 6, page 110). Les positions de ces amorces sur la séquence du gène *sthA*, ainsi que celles décrites par Suzuki et *al.* (2002), sont précisées dans l'annexe 3. La taille du produit d'amplification obtenu est de 142 paires de bases.

La spécificité des amorces pour le gène *sthA* de *S. natans* a été vérifiée en les confrontant aux séquences nucléotidiques publiées dans les bases de données avec le programme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) et plus précisément le programme Nucleotide Blast et l'algorithme Megablast, permettant de rechercher les séquences nucléotidiques similaires à une courte séquence d'entrée.

La base de données "nucleotide collection" a été choisie pour la confrontation avec les séquences de nos amorces. Les amorces ont dans un premier temps été confrontées à toutes les séquences nucléotidiques répertoriées dans les bases de données, puis dans un second temps uniquement aux séquences bactériennes. Les résultats obtenus face aux bases de données pour les bactéries sont présentés en annexe 3.

Les deux amorces du couple apparaissent comme très spécifiques du gène cible, puisque les séquences de 20 nucléotides des amorces ne sont retrouvées en intégralité que dans le génome de *Sphaerotilus natans*.

Le E value représente la probabilité que la séquence reconnue comme identique à la requête l'ait été par hasard. Donc plus sa valeur est faible, et plus la séquence est identifiée avec certitude.

- ✓ Pour l'amorce sthA FP, le E value pour la séquence correspondant à *S. natans* est de 0,007, alors que celui des cinq autres séquences les plus proches est de 1,8.
- ✓ Pour l'amorce sthA RP, le E value pour la séquence correspondant à *S. natans* est de 0,007, celui de la séquence suivante correspondant à *Bacteroides thetaiotaomicron* est de 0,45. Pour les autres séquences présentant une homologie avec la séquence de l'amorce sthA RP, la valeur de ce critère passe à 7.

Ces résultats permettent de mettre en évidence la spécificité, sur un plan théorique, des amorces sthA FP et sthA RP pour l'espèce *Sphaerotilus natans*, et pour le gène *sthA*.

1.4.1.2.2 Test des amorces *sthA FP* et *sthA RP*

Ces amorces ont été testées sur l'ADN de la souche *S. natans* 15291 avec le protocole de PCR précédemment décrit. Afin de déterminer les conditions de PCR optimales, une réaction avec un gradient de température d'hybridation compris entre 55 et 60°C (cf. Figure 74) a été réalisée. Le profil d'amplification complet est détaillé dans le tableau 15.

Activation de la Taq Polymérase	95°C	15 minutes	
	94°C	30 secondes	
Amplification du fragment du gène <i>sthA</i>	55 à 60°C	30 secondes	40 cycles
	72°C	30 secondes	
Extension finale	72°C	5 minutes	

Tableau 15 : Profil d'amplification utilisé pour déterminer la température d'hybridation optimale du couple d'amorces sthAFP/sthA RP.

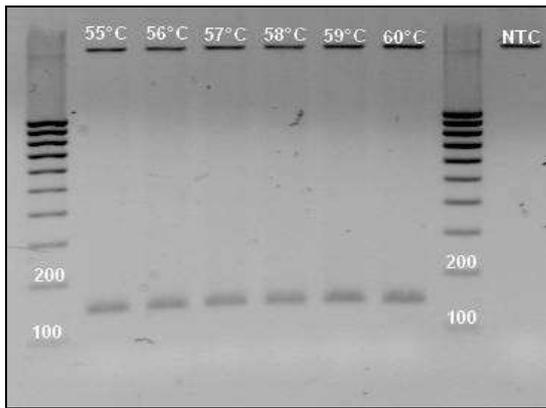


Figure 74 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % et visualisation à l'aide du bromure d'éthidium, pour les produits de PCR obtenus en utilisant les amorces *sthA* FP et *sthA* RP. La réaction a été réalisée en imposant un gradient de température d'hybridation compris entre 55 et 60°C, afin de déterminer la température optimale.

La réaction de PCR avec les amorces apparaît comme efficace pour toute la gamme de températures testée. On obtient une bonne amplification pour une température d'hybridation allant jusqu'à 60°C. Nous avons donc choisi d'utiliser pour les expérimentations suivantes une température d'hybridation intermédiaire de 58°C. La concentration en $MgCl_2$ utilisée est celle par défaut du kit ABsolute™ QPCR SYBR® Green (ABgene), à savoir de 1,5 mM finale.

La capacité du couple d'amorces choisi à amplifier le fragment de gène *sthA* chez l'ensemble des souches de *Sphaerotilus natans*, c'est à dire les 5 souches de collection et la souche, baptisée Roxane isolée par micromanipulation, a été testée (cf. Figure 75).

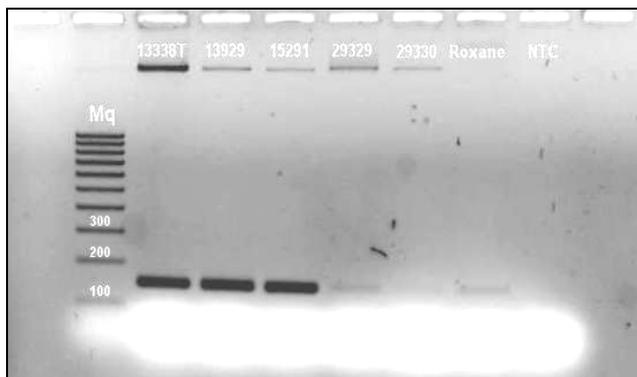


Figure 75 : Électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR obtenus à l'aide des amorces *sthA* FP et *sthA* RP à partir des ADN des différentes souches de *S. natans*.

L'information principale fournie par cette réaction de PCR est que le gène qui avait été identifié chez la souche *S. natans* 15291 est également présent chez les autres souches de *S. natans*, puisque l'on peut voir la formation d'un produit de PCR de la taille attendue, à savoir environ 150 paires de bases, pour chacune des souches.

Même si les quantités d'ADN génomique sur lesquelles ont été réalisées les réactions de PCR ne sont pas identiques pour toutes les souches, il apparaît que l'efficacité de la réaction n'est pas la même en fonction de la souche considérée. Dans la partie supérieure du gel, on peut observer une bande qui correspond à l'ADN génomique qui a servi de matrice pour la réaction de PCR. Pour les souches 13338T, 13929 et 15291, les réactions sont très efficaces. Le ratio de l'intensité de la bande correspondant à l'amplicon sur l'intensité de la bande correspondant à l'ADN génomique est en effet très élevé. Concernant les souches 29329 et 29330, on peut voir que l'efficacité d'amplification est nettement plus faible que pour les souches précédentes. En effet, les quantités d'ADN génomique introduites au départ de la réaction de PCR sont équivalentes à celles utilisées pour les souches 13929 et 15291, cependant on peut voir que l'intensité de fluorescence de la bande correspondant au produit d'amplification est beaucoup plus faible, et même extrêmement faible pour la souche 29330. Pour la souche Roxane, la quantité d'ADN génomique dont nous disposions au départ de la réaction était très faible, en effet aucune bande correspondant à l'ADN génomique n'est observée. Cependant une bande correspondant au fragment cible est présente sur le gel et l'efficacité de l'amplification semble supérieure à celle obtenue pour les souches 29329 et 29330. Cette différence d'efficacité d'amplification pourrait s'expliquer par des variations de la séquence du gène *sthA* entre les différentes souches de *S. natans*. Ainsi l'affinité des amorces pour les séquences cibles pourrait varier en fonction des souches, ce qui influencerait directement l'efficacité des réactions de PCR.

1.4.2 Détermination de la séquence du gène *sthA* pour les différentes souches de *S. natans*

Les différences d'amplification observées pour les différentes souches de *S. natans* concernant le gène *sthA* nous ont amené à déterminer la séquence du gène *sthA* des souches à notre disposition afin de voir s'il existait des différences importantes entre les souches.

1.4.2.1 Utilisation des amorces définies par Suzuki et al. (2002)

Dans leur article identifiant le gène *sthA*, Suzuki et al. (2002) ont décrit une paire d'amorces, UP1 et UP2, amplifiant un fragment de 2 300 paires de bases comprenant la totalité du gène. Ce sont donc ces amorces qui ont été choisies pour le séquençage du gène sur les différentes souches de *S. natans*. Le protocole de PCR est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent pour les amorces *sthA* FP et RP. Afin de déterminer la température d'hybridation la

plus adaptée, un gradient de température compris entre 55 et 60°C a été inclus au profil d'amplification. De la même façon, différentes concentrations en MgCl₂, comprises entre 0,8 et 1,5 mM, ont également été testées afin de déterminer les conditions de PCR optimales.

Malgré toutes ces tentatives d'optimisation, l'amplification du fragment d'ADN cible n'a été possible sur aucune des souches de *S. natans*, y compris la souche 15291 chez laquelle Suzuki *et al.* (2002) ont pourtant identifié ce gène.

1.4.2.2 Création d'amorces permettant d'amplifier la totalité du gène *sthA*

De nouvelles amorces permettant d'amplifier la séquence du gène dans son intégralité, et en particulier la portion contenant les amorces *sthA* FP et *sthA* RP, ont été créées. En utilisant la même démarche que précédemment, nous avons déterminé deux couples d'amorces¹ :

- ✓ *sthA* L1 FP/*sthA* L1 RP : ce couple couvre la séquence publiée par Suzuki *et al.*, et contenant le gène *sthA*, de la base 5 à la base 1731.
- ✓ *sthA* L2 FP/*sthA* L2 RP : ce couple couvre lui la séquence 136 à la base 1723.

Les positions de ces amorces sur la séquence du gène *sthA* sont représentées dans l'annexe 5. Il faut noter que la séquence AB050638 inclu des portions amont et aval du gène *sthA*. La portion de la séquence codant pour le gène *sthA* se situe entre les bases 237 et 1643 de la séquence publiée (Cf. Annexe 3). Ces deux couples d'amorces couvrent donc la totalité du gène.

Des réactions de PCR ont été réalisées en utilisant ces deux couples d'amorces et l'ADN des souches *S. natans* 15291 et 13338T comme matrice. Pour déterminer la température d'hybridation optimale, les réactions ont été faites en utilisant un gradient de température d'hybridation compris entre 50 et 60°C. De la même façon, la concentration optimale en MgCl₂ nécessaire à l'utilisation de ces deux couples d'amorces a été déterminée en testant une gamme de concentrations comprise entre 0,5 et 1,5 mM.

¹ Les séquences des amorces ainsi que leurs caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 6 page 103.

Malgré les différentes tentatives d'optimisation des conditions d'utilisation de ces deux couples d'amorces, aucune amplification des fragments attendus n'a pu être obtenue.

Dans un second temps, le gène *sthA* a été amplifié en le divisant en trois fragments chevauchants à l'aide de différents jeux d'amorces.

- 4 amorces sens : *sthA* L 24 FP, *sthA* L 75 FP, *sthA* L 832 FP, *sthA* L 915 FP
- 4 amorces anti-sens : *sthA* L 882 RP, *sthA* L 986 RP, *sthA* L 1723 RP, *sthA* L 1781 RP

Les numéros associés au nom des amorces correspondent à leur position sur la séquence AB050638. Leurs caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 6. Différents couples combinant ces amorces et les amorces *sthA* FP et *sthA* RP, ont été testés afin d'amplifier la séquence du gène *sthA*. Certaines associations d'amorces ne permettent pas d'obtenir d'amplification. Trois couples permettant d'amplifier la séquence du gène *sthA* de la base 24 à la base 1781 ont ainsi pu être définis.

- Couple 1 : *sthA* L 24 FP/*sthA* RP, amplifiant un fragment du gène *sthA* de 548 paires de bases.
- Couple 2 : *sthA* F/ *sthA* 986 RP, amplifiant un fragment du gène *sthA* de 556 paires de bases.
- Couple 3 : *sthA* L 832 FP/*sthA* L 1781 RP, amplifiant un fragment du gène *sthA* de 949 paires de bases.

La position des trois couples sur la séquence AB050638 est précisée en annexe 6. Les réactions de PCR sont réalisées en utilisant le même profil d'amplification que celui décrit pour les amorces *sthA* FP et *sthA* RP en fixant la température d'hybridation à 55°C (cf. Figure 76).

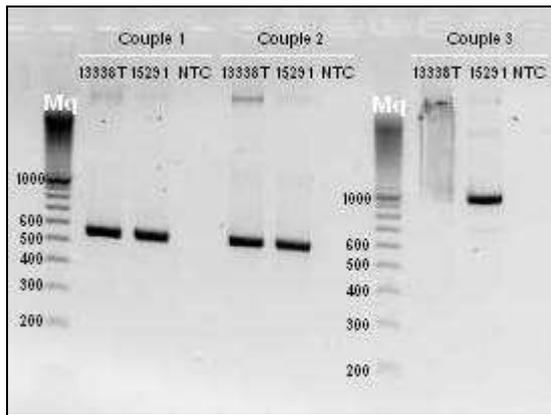


Figure 76 : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR obtenus à partir d'ADN des souches 13338T et 15291, en utilisant les couples d'amorces créés pour le séquençage du gène *sthA*. Le couple 1 correspond au couple *sthA* L 24 FP/*sthA* RP, le couple 2 correspond au couple *sthA* F/ *sthA* 986 RP, et le couple 3 correspond au couple *sthA* L 832 FP/*sthA* L 1781 RP.

Les réactions de PCR sont réalisées avec les trois couples d'amorces sur les six souches à notre disposition. Les produits d'amplification sont ensuite clonés. Une fois l'ADN plasmidique purifié, le séquençage est réalisé par la société MWG. Les séquences sont alignées grâce au programme Geneious Pro 3.5.6.

1.4.2.3 Résultats de séquençage

Les différentes séquences du gène *sthA* des souches de *S. natans* étudiées sont regroupées dans l'annexe 9.

La séquence du gène *sthA* n'a pu être déterminée de façon complète que pour les trois souches 13338T, 13929 et 15291 de *S. natans*. Une analyse par paire (pairwise analysis) indique que ces trois séquences présentent un taux de similarité de 95,6% (Annexe 9-A). La souche 13338T est celle qui présente le plus fort taux de variation par rapport à la séquence de référence issue de la souche 15291, avec 95,2% de similarité. La souche 13929 en présente 97,8%.

Pour les trois autres souches étudiées, 29329, 29330 et Roxane, malgré de nombreuses tentatives nous n'avons pas pu amplifier et cloner le fragment 2, borné par le couple d'amorces *sthA* FP/ *sthA* 986 RP. Cette portion du gène doit donc être celle qui présente le plus fort taux de variation entre les souches, y compris au niveau des amorces utilisées pour l'amplification du fragment, en particulier pour l'amorce *sthA* 986 RP. En effet, la portion de gène contenant l'amorce *sthA* FP a été séquencée pour les six souches et s'avère être très conservée.

Les séquences du fragment 1 du gène *sthA*, amplifiées à l'aide du couple d'amorces *sthA* L FP 24/*sthA* RP ont été alignées (Annexe 9-B). Les six séquences présentent un taux de

similarité de 98,1%. C'est encore une fois la souche 13338T qui présente le plus fort taux de variation pour cette portion du gène parmi les six souches. Son taux de similarité avec la séquence référence de la souche 15291 est de 96%, alors que pour les autres souches il est de 99,3%.

Concernant le fragment 3 de gène *sthA*, amplifiée par le couple d'amorces *sthA* L 832 FP/*sthA* L 1781 RP, seules les séquences de 5 souches ont été alignées (Annexe 9-C). La séquence de la souche 29329 présente très peu d'homologie avec celles des autres souches. Il peut donc s'agir d'un problème lié au séquençage, à la réaction de PCR, ou bien tout simplement au fait que la séquence du gène *sthA* varie très fortement pour cette souche. Mais cela semble cependant assez peu vraisemblable vu le peu d'homologie avec la séquence de référence (54,9%). En ce qui concerne les autres souches de *S. natans*, elles présentent un taux d'homologie de 95,5% (Annexe 9-C). Une nouvelle fois, la souche 13338T présente le plus grand nombre de variations par rapport à la séquence de référence et possède un taux d'homologie de 91,3%. Les séquences des souches 15291, 13929, 29330 et Roxane, ont un taux d'homologie supérieur à 97%.

1.4.2.4 Conclusion

D'après ces résultats, la séquence du gène *sthA* apparaît très conservée entre les différentes souches de *S. natans* pour les fragments 1 et 3. Pour les souches 13338T, 13929 et 15291, le gène a été séquencé dans sa totalité et une séquence consensus a été définie (Annexe 9-D). Le fragment 2 semble être celui qui présente le plus de variations entre les souches, puisqu'il n'a pas pu être amplifié pour trois d'entre-elles. Des variations de séquences doivent donc être présentes, notamment au niveau de l'amorce *sthA* L 986 RP. Sur les portions disponibles, la souche 13338T apparaît comme étant celle présentant le plus de divergences avec les 5 autres souches.

Concernant la souche Roxane, la séquence du gène *sthA* est celle présentant le plus fort taux d'homologie avec la souche de référence 15291, 99,98% sur le fragment 1, et 100% pour le fragment 3. Il est surprenant que le fragment 2 du gène n'ait pas été amplifié lors de la réaction de PCR alors que la séquence du gène semblait très conservée chez ces deux souches.

Le séquençage complet du gène *sthA* pour les souches 29329, 29330 et Roxane devra être réalisé. La mise au point d'amorces et la détermination de conditions de PCR permettant

l'amplification du gène en un unique fragment permettrait de pouvoir comparer ces séquences de façon plus aisée. Il est à noter que les souches 29329 et 29330, dont le fragment non séquencé pourrait se révéler différent, sont celles qui présentent la moins bonne induction de la filamentation. Le gène *sthA* pourrait alors être, au moins en partie, responsable des différences de morphologie adoptées par ces deux groupes pour des conditions environnementales identiques.

1.4.3 Étude de l'expression du gène *sthA* en fonction de la morphologie adoptée par *S. natans* par RT-PCR quantitative en temps réel

Les précédentes observations concernant les amorces du gène *sthA* décrites par Suzuki *et al.* laissent à penser que leurs résultats concernant la variation du niveau d'expression de ce gène entre les formes dispersées et filamenteuses peuvent être discutés. L'expression du gène *sthA* a été déterminée par RT-PCR quantitative en utilisant le couple d'amorces *sthA* FP/*sthA* RP pour les souches *S. natans* 13338T, 13929 et 15291, sous forme dispersée et filamenteuse.

1.4.3.1 Mise au point

Comme cela a déjà été expliqué, l'expression du gène *sthA* est déterminée de façon relative, c'est-à-dire en la normalisant par rapport à celle d'un gène de référence dont l'expression est supposée constante. Le gène de référence choisi dans cette étude est celui de l'ADN 16S. Les réactions sont réalisées avec le couple d'amorces *sthA* FP/*sthA* RP, pour l'expression de *sthA*, et le couple 357F/518R pour celle du gène 16S.

Différents couples d'amorces ont été testés pour le gène 16S (Figure 77). Deux couples ont montré une efficacité de PCR satisfaisante : le couple 357F/518R et le couple F-tot/R-tot. Le premier couple a été retenu pour suivre l'expression du gène 16S car il produit un amplicon de 162 paires de bases, très proche de la taille du produit d'amplification des amorces utilisées pour le gène *sthA*, alors que les amorces F-tot/R-tot produisent un fragment d'environ 300 paires de bases.

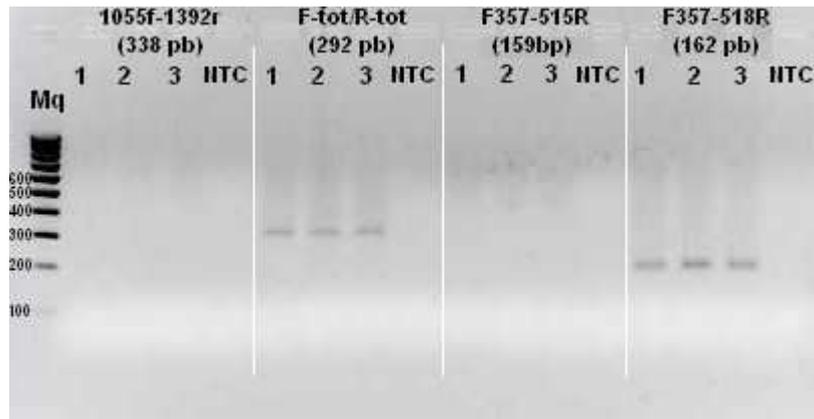


Figure 77 : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR obtenus lors du test des différents couples d'amorces pour l'amplification d'un fragment de l'ADN 16S. L'amplification a été réalisée sur l'ADN de trois souches de *S. natans* : 13338T (1), 13929 (2) et 15291 (3). La taille du produit d'amplification attendue est indiquée en dessous de chaque couple d'amorces en paires de bases (pb).

Des réactions de PCR quantitatives pour l'amplification du gène *sthA* et 16S ont été réalisées afin de déterminer l'efficacité d'amplification des deux jeux d'amorces. Une droite standard a été établie à partir d'ADN extrait de la souche 15291, lequel a subi une série de dilutions au 5^{ème}. Les concentrations utilisées pour la construction de cette droite sont de 0,008; 0,04; 0,2; 1 par rapport à la solution stock d'ADN. L'efficacité de la réaction de PCR est déterminée en fonction de la pente de la droite standard, une pente de -3,32 correspondant à une efficacité de PCR de 100%.

Le profil d'amplification de la réaction de PCR est indiqué dans le tableau suivant :

Activation de la Taq polymérase	95°C	10 minutes	
Amplification du fragment d'intérêt	95°C	30 s	
	56°C	30 s	40 cycles
	72°C	30 s	
Courbe de dissociation	95°C	1 min	
	55°C → 95°C	30 s par palier de 1°C	41 cycles

Tableau 16 : Profil d'amplification employé pour les réactions de PCR quantitative en temps réel utilisant les couples d'amorces *sthAFP/sthA RP* et *F357/518R*.

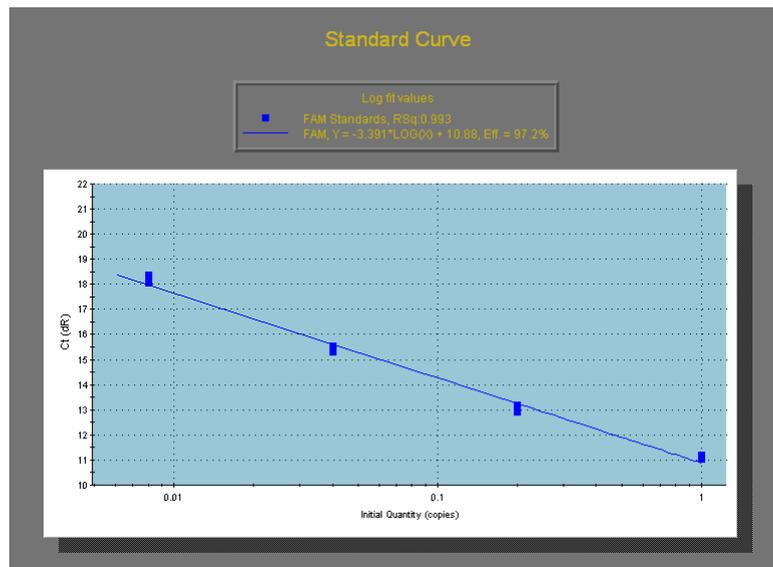


Figure 78 : Droite standard obtenue après amplification du fragment du gène *sthA* de *S. natans* 15291 avec le couple d'amorces *sthA* FP/*sthA* RP.

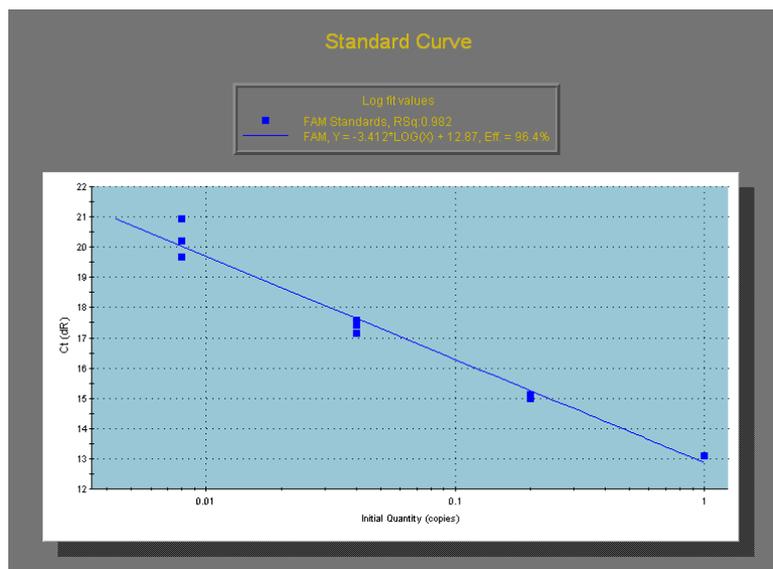


Figure 79 : Droite standard obtenue après amplification du fragment de l'ADNr 16S de *S. natans* 15291 avec le couple d'amorces 357F/518R

Les droites standards obtenues avec les amorces spécifiques du gène *sthA* et de l'ADN 16S (cf. Figure 78 et 79) ont respectivement des pentes de -3,391 et -3,412, ce qui correspond à des efficacités de PCR de 97,2% et 96,4%. Elles sont donc satisfaisantes pour les deux couples sélectionnés.

Immédiatement après la fin de la réaction de PCR, une courbe de dissociation est réalisée. Comme cela a déjà été décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes, cette étape permet de mettre en évidence la présence éventuelle de produits d'amplification différents du fragment souhaité.

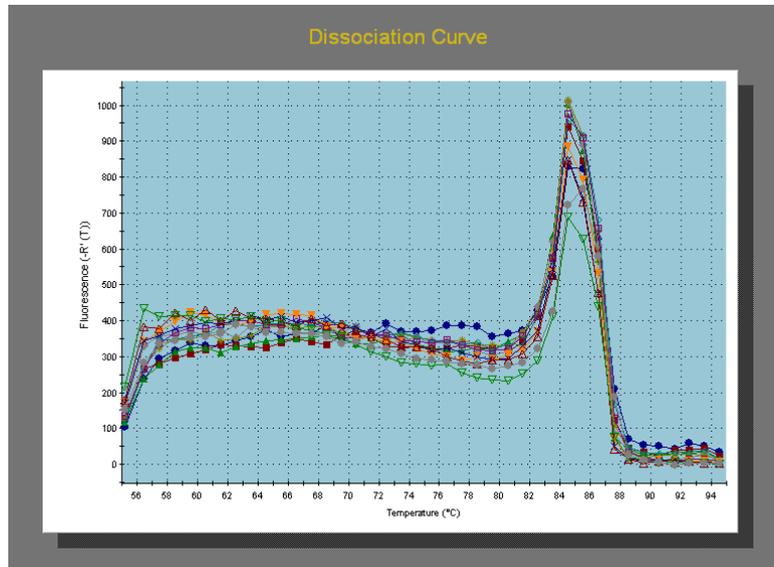


Figure 80 : Courbe de dissociation obtenue après amplification du fragment du gène *sthA* de *S. natans* 15291 avec le couple d'amorces *sthA* FP/*sthA* RP.

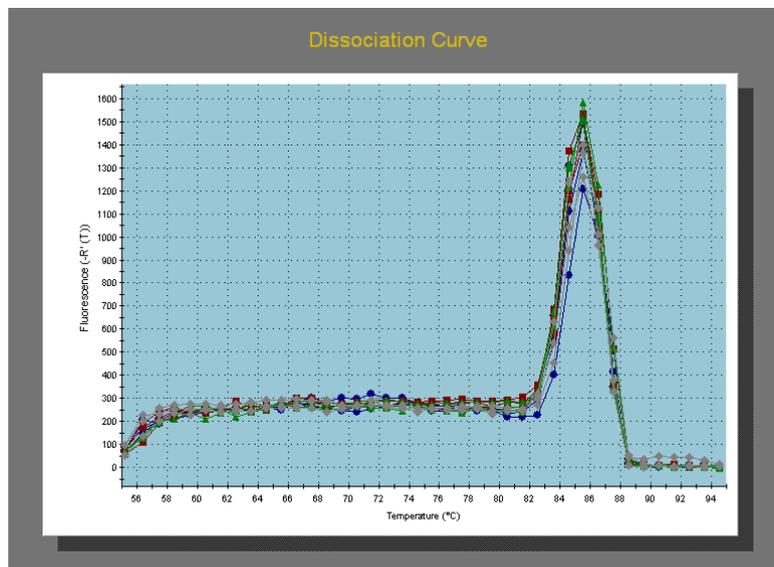


Figure 81 : Courbe de dissociation obtenue après amplification de l'ADNr 16S de *S. natans* 15291 avec le couple d'amorces. 357F/518R

Dans les deux cas, un seul pic de fluorescence est observé (cf. Figure 80 et 81), ce qui signifie que chacune des réactions de PCR engendre l'amplification d'une seule séquence nucléotidique. Des électrophorèses sur gel d'agarose à 2% ont permis de vérifier que la taille

des ces produits d'amplification correspondait à celle attendue, à savoir 143 paires de bases pour le gène *sthA*, et 162 pour l'ADNr 16S.

1.4.3.2 Différence d'expression entre bactéries dispersées et filaments

Plutôt qu'une quantification, il s'agit ici d'une comparaison du niveau d'expression du gène *sthA* entre l'état filamenteux et monocellulaire des bactéries. Le niveau d'expression est déterminé en utilisant la méthode de calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite dans le chapitre précédent. Le témoin servant à normaliser le niveau d'expression est dans chaque cas l'ARN extrait de la souche bactérienne sous sa forme dispersée, si bien que son niveau d'expression pour le gène *sthA* est nécessairement de 1.

Les ARN totaux des trois souches *S. natans* 13338T, 13929 et 15291 sous leurs deux morphologies sont extraits comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes, puis dosés. L'ADNc est synthétisé à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant comme amorces des séquences hexamériques aléatoires. Cet ADNc est ensuite dilué au 5^{ème} et 3 µl de cette solution sont utilisés comme matrice pour la réaction de PCR. Les réactions sont à chaque fois réalisées en duplicat pour tous les échantillons. Le profil d'amplification est identique à celui décrit dans le paragraphe précédent.

Les cycles seuils obtenus avec les deux jeux d'amorces *sthA* et 16S sont utilisés afin de comparer l'expression du gène en utilisant la méthode de calcul du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cf. Tableau 17).

Échantillon	Ct _{cible}	Ct _{cible} moyen	Ct _{ref.}	Ct _{ref.} moyen	$\Delta Ct = \frac{Ct_{cible}}{Ct_{ref.}}$	$\Delta\Delta Ct$	$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$
Témoin	32,58	32,59	18,06	18,04	14,54	0	
	32,6		18,03				
13338T D	32,58	32,59	18,06	18,04	14,54	0	1
	32,6		18,03				
13338T F	30,99	31,06	18,73	18,96	12,10	-2,44	5,42
	31,14		19,19				

Tableau 17 : Exemple de détermination du niveau d'expression du gène *sthA* pour la souche 13338T sous forme dispersée (13338T D) et filamenteuse (13338F).

La figure 82 illustre les résultats obtenus pour les trois souches étudiées. On observe ainsi que pour chacune d'elles, le gène *sthA* est plus exprimé dans les bactéries à l'état filamenteux que dans les bactéries à l'état dispersé. Les souches *S. natans* 13338T et 13929 expriment en moyenne cinq fois plus le gène *sthA* à l'état filamenteux qu'à l'état dispersé. La différence

d'expression entre les deux états est encore plus importante pour la souche 15291 où *sthA* s'exprime en moyenne sept fois plus lorsque la bactérie se développe sous forme de filament.

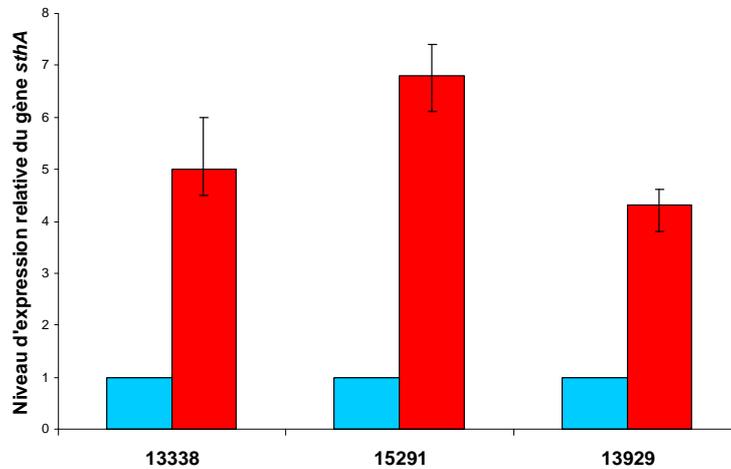


Figure 82 : Comparaison du niveau d'expression du gène *sthA* des formes monocellulaire (■) et filamenteuse (■) chez les souches *S. natans* 13338T, 15291 et 13929.

Ces résultats montrent que l'orientation de la bactérie vers la forme filamenteuse s'accompagne directement d'une augmentation de l'expression du gène *sthA*. Ces résultats sont en contradiction avec ceux présentés par Suzuki *et al.* (2002), qui n'avaient pas trouvé de différence d'expression entre les formes monocellulaire et filamenteuse de *S. natans* 15291, même s'ils avaient démontré que le gène *sthA* est indispensable à la filamentation.

La différence d'expression du gène pour les formes filamenteuse et dispersée n'a pas été déterminée pour les souches *S. natans* 29329 et 29330 en raison des Ct très tardifs observés pour ces souches. En effet, les Ct obtenus pour ces souches sont compris entre 34 et 37. Ces valeurs sont trop élevées pour pouvoir raisonnablement estimer l'expression d'un gène. Il faut noter qu'en théorie, lors d'une réaction de PCR quantitative utilisant le SYBR Green, si une seule copie du gène cible est présente lors de la réaction et que l'efficacité de PCR est de 100%, la valeur du cycle seuil sera statistiquement de 37,2. Les résultats pour ces trois souches étant très proches de cette valeur, l'expression du gène *sthA*, est négligeable dans ces conditions. Étant donné que les résultats du séquençage du gène *sthA* n'ont montré aucune variation de séquence au niveau de la position des amorces utilisées en QPCR, ceci voudrait donc dire que le gène *sthA* n'est pas exprimé chez ces souches dans les conditions de culture étudiées. Le très faible niveau d'expression de ce gène essentiel au phénomène de filamentation, pourrait donc être, au moins en partie, à l'origine du comportement des souches 29329 et 29330 qui se développent préférentiellement sous forme dispersée.

1.4.3.3 Variation de l'expression lors du processus de filamentation

La variation de l'expression du gène *sthA* entre les formes dispersée et filamenteuse de *S. natans* démontrée, la cinétique de l'expression du gène *sthA* lors du passage de la forme monocellulaire à la forme filamenteuse a alors été déterminée.

La croissance filamenteuse d'une population de *S. natans* 15291 uniquement sous forme dispersée a été induite en la transférant dans le milieu de croissance précédemment décrit. Des prélèvements de 5 mL sont réalisés 0, 4, 8, 12 et 24 heures après l'ensemencement de la culture. Puis l'ARN total est extrait des bactéries collectées. Une réaction de transcription inverse est réalisée à partir de 500 ng d'ARN total.

Le niveau d'expression normalisé du gène *sthA* des différents échantillons est comparé à celui de l'échantillon correspondant au temps initial de la culture : à T0, le niveau d'expression du gène *sthA* est de 1. Le niveau d'expression du gène augmente fortement lors des dix premières heures de culture avant d'atteindre un plateau qui apparaît comme son niveau d'expression maximum, puisqu'il reste stable jusqu'à 24 heures après le début de la culture (Figure 83).

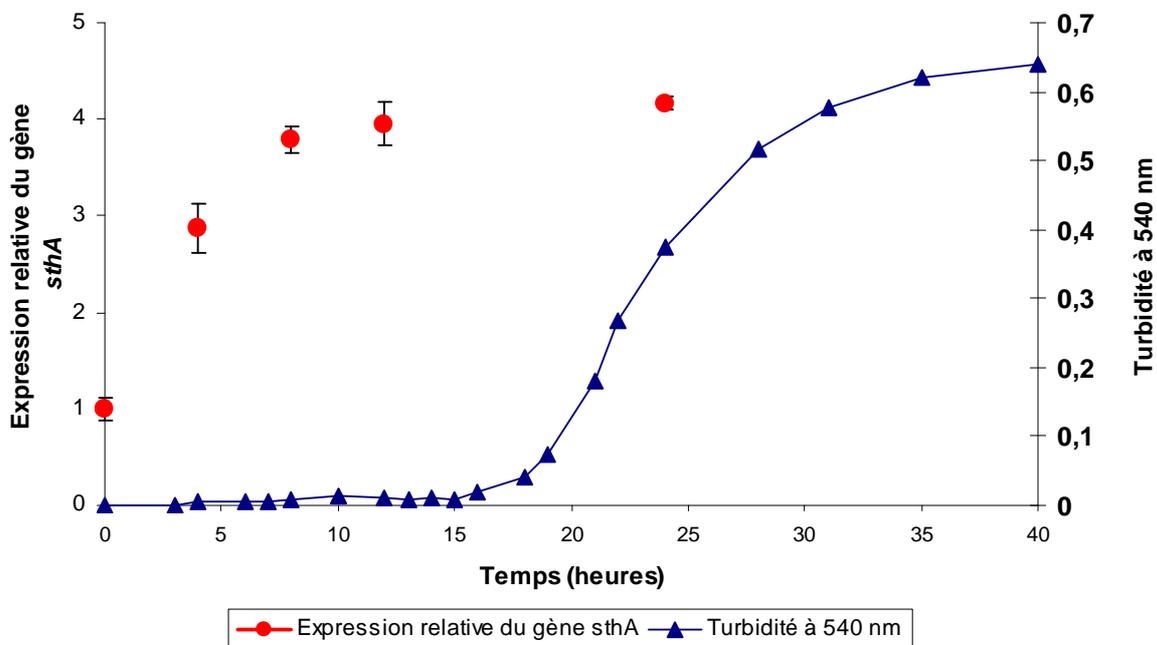


Figure 83 : Courbe de croissance de la souche *S. natans* 15291 (▲) durant l'induction de la filamentation par transfert des bactéries dispersées dans un milieu pauvre en nutriment, et évolution du niveau d'expression du gène *sthA* (●) lors de la croissance.

Lorsque l'on superpose la courbe du niveau d'expression du gène *sthA* avec la courbe de croissance de *S. natans* 15291, on s'aperçoit qu'elle augmente très rapidement après le transfert dans le milieu inducteur de la filamentation. Lors des quatre premières heures de culture, le niveau d'expression du gène est presque multiplié par trois, alors que la culture bactérienne est encore en phase de latence. Après huit heures, la population est toujours dans sa phase de latence mais l'expression du gène est déjà très proche de la valeur plateau que l'on observe après douze heures de culture, quand la croissance entre dans sa phase exponentielle. Cette valeur reste stable lorsque la croissance entame sa phase stationnaire.

L'augmentation de l'expression du gène *sthA* se produit très tôt dans le cycle de croissance, dès la phase de latence. La précocité de l'augmentation de l'expression tendrait à prouver que *sthA* serait un des premiers gènes mis en jeu, dans le cas où la filamentation serait issue de l'activation de toute une série de gènes. Cependant, ce gène n'aurait pas simplement un rôle initiateur de ce processus puisqu'il reste fortement exprimé tout au long de la croissance filamenteuse.

1.4.3.4 Conclusion

Cette étude a mis en évidence que le gène *sthA* est présent dans le génome de toutes les souches de *Sphaerotilus natans* dont nous disposons. Il semble cependant que la séquence de ce gène présente quelques variations entre les souches.

Contrairement à ce qui avait été précédemment décrit (Suzuki, 2002), il s'avère que ce gène est cinq à sept fois plus exprimé chez les bactéries à l'état de filament que sous forme monocellulaire. Ce gène s'exprime très tôt lors de l'orientation de la croissance vers sa forme filamenteuse, dès la phase de latence, et une fois son niveau maximum atteint, cette expression reste stable tout au long de la croissance. Ces éléments tendraient donc à montrer que le gène *sthA* et son produit sont des éléments essentiels à l'induction de cette forme de croissance, mais qu'ils joueraient également un rôle dans l'élaboration du filament, plus probablement dans la synthèse de la gaine polysaccharidique, comme le montre son expression élevée tout au long de la croissance.

Une identification et une caractérisation de la protéine codée par le gène *sthA* sont des étapes indispensables pour déterminer son rôle exact dans la formation du filament, mais également pour avancer dans la compréhension globale de ce mécanisme.

1.4.4 Utilisation des amorces *sthA* pour la quantification de *S. natans* en boues activées

Les observations faites lors de précédents travaux ont démontré que des bactéries filamenteuses peuvent également exister à l'état dispersé dans des boues activées, et ainsi passer totalement inaperçues. Cependant, un brusque changement des conditions environnementales, peut entraîner une prolifération de la croissance filamenteuse. Une estimation de cette population monocellulaire pourrait permettre d'évaluer les risques potentiels de survenue d'un épisode de bulking ou de foaming. À l'heure actuelle, à l'exception du FISH, aucun moyen de détection de ces microorganismes n'est disponible. C'est pourquoi un des objectifs initiaux de ce travail de thèse était de mettre en place une technique de QPCR permettant de quantifier la population globale de *Sphaerotilus natans*, indépendamment de sa morphologie.

1.4.4.1 Stratégie d'utilisation de l'ADN 16S

La stratégie a tout d'abord été d'utiliser l'ADNr 16S comme cible pour les amorces destinées à la quantification des microorganismes. Afin d'être le plus spécifique possible, nous avons aligné, à l'aide du programme Clustalw, sa séquence avec celles de deux espèces différentes de *Leptothrix* : *discophora* et *mobilis*. Le genre *Leptothrix* est le plus proche de *Sphaerotilus* d'un point de vue phylogénétique.

Les amorces ont été définies à l'aide du programme Primer3, avec une contrainte supplémentaire par rapport à celles imposées pour les amorces du gène *sthA*, à savoir qu'elles soient situées dans des régions où les séquences de l'ADNr 16S de *Sphaerotilus* et de *Leptothrix* présentent des différences.

Deux couples d'amorces ont été ainsi créés^j. L'un avec des amorces d'une taille de 20 bases, appelées 16S sna 1 FP et RP, l'autre avec des amorces d'une taille de 25 bases, appelées 16S sna 2 FP et RP (cf. Figure 84).

- L'amorce sens ou forward 16S sna 1 FP se situe au niveau des bases 761 à 781 de l'ADNr 16S de *S. natans*. Dans cette portion du gène, la séquence de *S. natans* diffère en trois positions, dont une délétion de deux nucléotides par rapport celle de *Leptothrix*. L'amorce anti-sens 16S sna 1 RP se situe au niveau des positions 951 à 971 de la séquence de l'ADNr 16S où l'on retrouve trois à quatre variations avec celles des deux souches de *Leptothrix*. Ce couple 16S sna 1 permet la synthèse d'un produit d'amplification de 210 paires de bases.
- L'amorce sens, 16S sna 2 FP, se situe au niveau des bases 800 à 825 de la séquence d'ADNr 16S. À ce niveau là, celle de *S. natans* possède une délétion de deux bases par rapport à celle de *Leptothrix*. L'amorce anti-sens se situe au niveau des bases 931 et 956. Cette portion l'ADN de *S. natans* présente quatre substitutions de nucléotides par rapport à celle des 2 espèces de *Leptothrix*. Ce couple 16S sna 2 amplifie un fragment de 156 paires de bases.

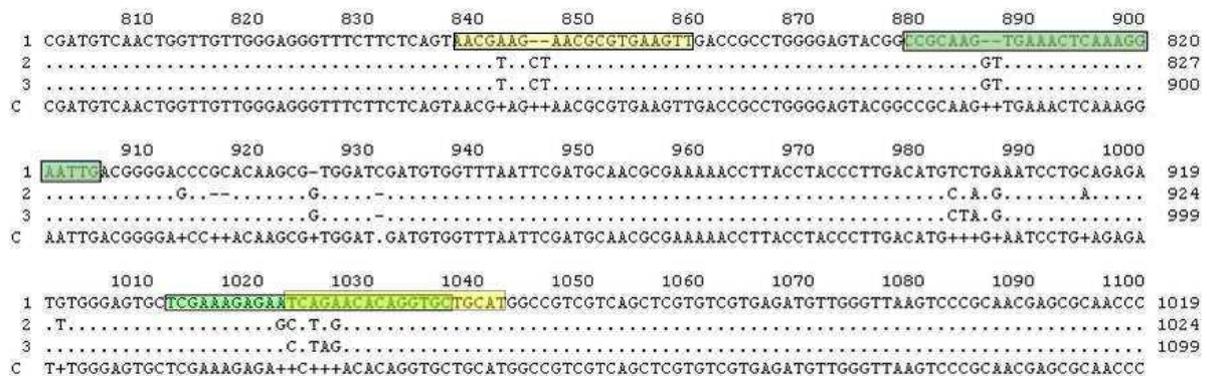


Figure 84 : Alignement à l'aide du programme Clustalw des séquences de l'ADN 16S de (1) *Sphaerotilus natans*, (2) *Leptothrix discophora* et (3) *Leptothrix mobilis*, détermination d'une séquence consensus (C), et positionnement des amorces sens et anti-sens pour les couples 16S sna 1 (■) et 16S sna 2 (■).

Comme cela a précédemment été décrit pour les amorces sthA FP et sthA RP, des analyses utilisant le programme BLAST ont été menées afin de déterminer la spécificité des séquences nucléotidiques choisies comme amorces pour l'espèce *S. natans*^k.

^j Les séquences, Tm et tailles des amorces sont détaillées dans le Tableau 6, page 103.

- Concernant le couple 16S sna 1, les résultats du BLAST indiquent que l'amorce FP est très spécifique de *S. natans*. En effet la séquence de l'ADNr 16S de la bactérie sort en première position avec un score de 40,1 et un E value de 0,007. En revanche, l'amorce RP ne semble pas spécifique de la bactérie. En effet, les résultats de l'analyse BLAST montrent que cette séquence correspond à une portion très conservée chez de nombreuses espèces bactérienne (score de 40,1 et E value de 0,008).
- Pour le couple 16S sna 2, les deux amorces sont très spécifiques de *S. natans*. Elles obtiennent chacune des scores de 50,1 pour les séquences correspondant à la bactérie, et des E values de $2 \cdot 10^{-5}$.

Des réactions de PCR utilisant chaque couple d'amorces sont réalisées sur les ADN des six souches de *S. natans* (cf. Figure 85).

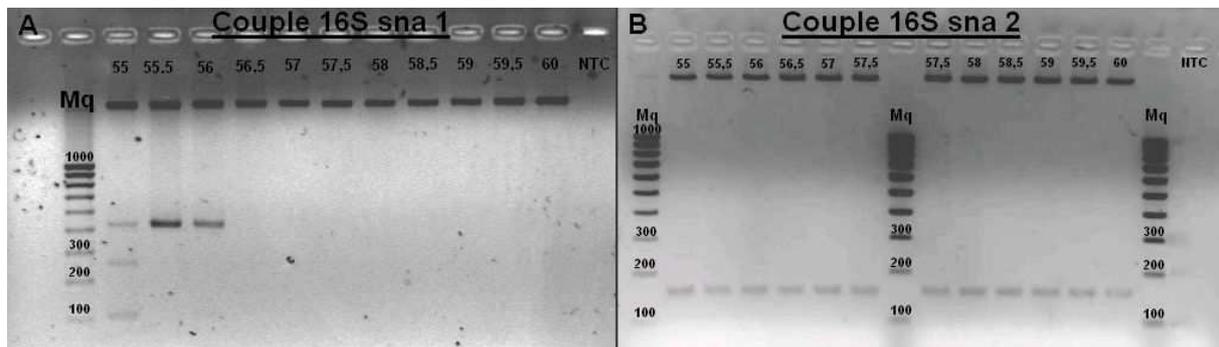


Figure 85 : Électrophorèses sur gel d'agarose à 1,5% des produits de PCR obtenus en utilisant les couples A) 16S sna 1 et B) 16S sna 2 à partir d'ADN de la souche *S. natans* 15291. Un gradient compris entre 55 et 60°C a été réalisé pour la température d'hybridation.

- Pour le couple 16S sna 1, des fragments d'ADN sont amplifiés dans certains cas mais aucun fragment d'ADN correspondant à celui attendu n'a été observé malgré les tentatives d'ajustement de la température d'hybridation ou de la concentration en $MgCl_2$ lors de la réaction de PCR.
- Concernant le couple 16S sna 2, un fragment d'environ 150 paires de bases est amplifié pour chacune des six souches étudiées. Cette taille correspond à celle attendue, à savoir 156 paires de bases.

^k Les illustrations des résultats sont présentées dans l'annexe 7.

Un seul des couples définis est donc utilisable en PCR. Afin de vérifier la spécificité du couple 16S sna 2 pour *S. natans*, son efficacité a été testée sur les souches *Leptothrix mobilis* et *Leptothrix discophora* (EU 23).

L'amplification d'un fragment de taille équivalente à celui amplifié à partir de l'ADN de *S. natans* est obtenue à partir des ADN de *L. mobilis* et *L. discophora* (cf. Figure 86). Cette amplification pourrait être le résultat de conditions de PCR non optimales. Des variations de certains paramètres ont été effectuées afin de rendre la réaction plus spécifique de *S. natans* :

- Température d'hybridation : la réaction initiale a été réalisée avec une température d'hybridation de 55°C. Un gradient de température compris entre 56 et 60°C est donc appliqué.
- Des concentrations finales en MgCl₂ de 0,8 ; 1 ; 1,2 et 1,5 mM sont testées.

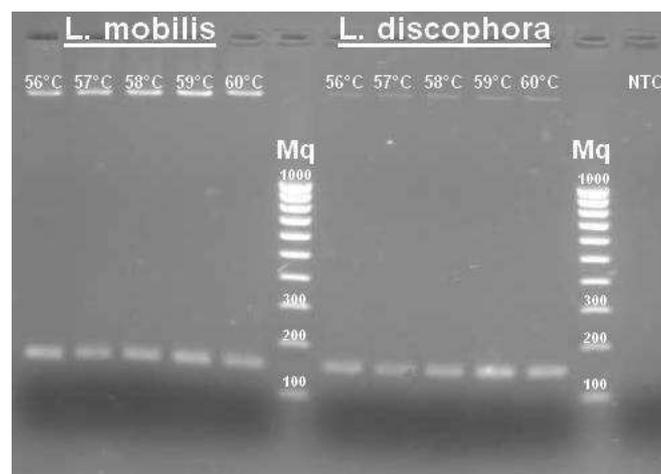


Figure 86 : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR obtenus à partir de l'ADN de *L. mobilis* et *L. discophora* (EU23), en utilisant le couple 16S sna 2. Un gradient compris entre 55 et 60°C est appliqué pour la température d'hybridation.

Dans tous les cas, il y a amplification du fragment d'ADNr 16S des deux souches de *Leptothrix* et il n'est pas possible de définir des conditions permettant d'amplifier spécifiquement la portion d'ADNr 16S de *S. natans*.

Des réactions de PCR utilisant le couple 16S sna 2 ont été réalisées sur des ADN de différentes souches bactériennes parmi lesquelles : *Haliscomenobacter hydrossis*, *Thiothrix nivea*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus delbruekii*, *Pseudomonas mendocina*. L'amplification du fragment d'ADNr 16S n'a pu être obtenue pour aucune de ces souches.

1.4.4.2 Conclusions

Le couple d'amorces 16S sna 2 n'est donc pas utilisable pour quantifier de façon spécifique l'espèce bactérienne *Sphaerotilus natans*. Le fait que ces amorces amplifient également l'ADN 16S de *Leptothrix*, vient d'une part de la similarité des séquences, et d'autre part du fait que les extrémités 3' des amorces définies sont trop éloignées des différences de séquences entre les deux espèces. Les amorces pourraient s'hybrider partiellement à partir de leur extrémité 3' et donc permettre l'amplification de la séquence d'ADN 16S. Cependant, la séquence du gène est telle qu'il s'avère très difficile de définir des amorces dans ces régions particulières, et pouvant répondre aux exigences d'une utilisation en QPCR avec la chimie SYBR Green. De nouvelles amorces pourraient être définies en positionnant les portions de séquences spécifiques de *S. natans* très près de l'extrémité 3' des amorces

1.4.4.3 Stratégie d'utilisation du gène *sthA*

L'utilisation des amorces ayant pour cible l'ADNr 16S ne permettant pas une amplification spécifique de l'ADN de *S. natans*, une autre cible a été choisie. Des amorces utilisables en QPCR ayant été définies pour le gène *sthA*, c'est sur ce dernier que s'est porté notre choix.

1.4.4.3.1 Recherche du gène *sthA* chez d'autres microorganismes

Pour savoir si le couple d'amorces défini pour le gène *sthA* peut être utilisé pour quantifier de façon spécifique *Sphaerotilus natans*, il est essentiel de savoir si on retrouve ce gène chez d'autres espèces bactériennes, et en particulier chez les plus proches phylogénétiquement comme *Leptothrix*.

Une réaction de PCR utilisant le couple *sthA* FP/*sthA* RP a été réalisée sur les ADN de *S. natans* 15291, *L. mobilis* et *L. discophora*. Parallèlement, nous avons réalisé la même réaction en utilisant les amorces *sthA* FOR et *sthA* REV décrites par Suzuki *et al.* (2002) pour le gène *sthA* (cf. Figure 87). En effet, dans cette étude les auteurs décrivent, en se basant sur des données non publiées, la présence de ce gène dans le génome de *L. discophora*.

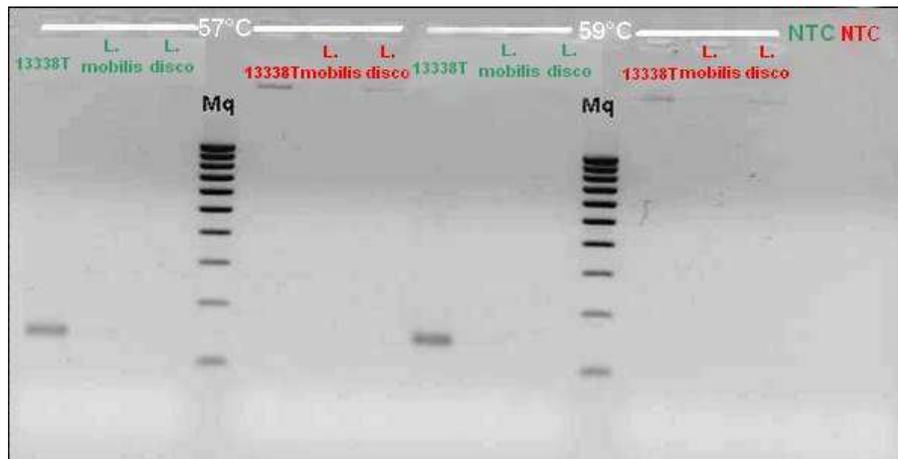


Figure 87 : Electrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR obtenus en utilisant les amorces *sthA* FP et RP (vert) et les amorces *sthA* FOR et *sthA* REV (rouge) à partir d'ADN des souches *S. natans* 13338T, *L. mobilis* et *L. discophora* (EU 23).

Il ressort de ces tests que les amorces *sthA* définies lors de notre étude ne permettent pas l'amplification du fragment cible pour les espèces *L. mobilis* et *L. discophora*. Comme cela a été montré précédemment, ces amorces amplifient le gène *sthA* à partir de l'ADN de toutes les souches *S. natans* à notre disposition (Cf. Figure 75) Donc, contrairement aux amorces définies pour l'ADNr 16S, le couple *sthA* FP/*sthA* RP permet de différencier les souches de *S. natans* des souches de *Leptothrix*.

Il ressort également de ces résultats que les deux jeux d'amorces utilisés, n'ont pas pu mettre en évidence la présence du gène *sthA* dans le génome des deux souches de *Leptothrix*, y compris pour *L. discophora* chez laquelle Suzuki et al. (2002) disaient pourtant l'avoir identifié. Cette absence d'amplification ne signifie pas nécessairement que le gène *sthA* est absent du génome de *Leptothrix*, mais qu'il existe une variabilité de séquence importante, au moins dans les régions ciblées par ces amorces.

Comme cela a été décrit pour les amorces 16S *sna*, les amorces *sthA* FP et *sthA* RP ont été testées sur des ADN d'espèces bactériennes plus éloignées de *S. natans* : *Thiothrix*, *H. hydrossis*, *E. coli*, *P. mendocina*. Cette analyse, non exhaustive, cible des bactéries relativement éloignées phylogénétiquement de *S. natans*. Cependant, *Thiothrix* et *Haliscomenobacter hydrossis*, sont des bactéries filamenteuses, Gram-négatives et gainées et peuvent donc potentiellement posséder soit le gène *sthA* soit un gène homologue au sein de leur génome.

Aucune amplification d'un fragment d'ADN correspondant à celui attendu n'a été obtenue pour ces différentes espèces bactériennes. Ces résultats, nous permettent de conclure que le gène *sthA*, ou du moins la portion du gène ciblée par les amorces *sthA* FP et *sthA* RP, est très spécifique de l'espèce *Sphaerotilus natans*. Ce couple d'amorces peut donc être utilisé pour quantifier précisément cette espèce dans une matrice complexe.

1.4.4.3.2 Mise au point de la quantification par QPCR.

La première étape est de réaliser une quantification à partir d'une culture pure de *S. natans* 15291 sous forme dispersée. Les bactéries ayant poussé sur milieu gélosé NB 0,5% sont collectées et reprises dans 10 mL de PBS stérile. La suspension cellulaire est alors passée dans un filtre à seringue d'une porosité de 5 μm . Les cellules contenues dans 500 μL de filtrat sont marquées au cFDA en suivant le protocole précédemment décrit, puis quantifiées par cytométrie en flux, afin de déterminer leur concentration. À partir de cette suspension, une série de dilutions est réalisée afin d'obtenir des suspensions contenant 1.10^8 , 5.10^7 , 1.10^7 , 5.10^6 , 1.10^6 , 5.10^5 , 1.10^5 , 5.10^4 , 1.10^4 cellules.mL⁻¹. L'ADN est ensuite extrait à partir de 500 μL de chacune de ces solutions. Ces différentes fractions sont toutes reprises dans 100 μL d'eau ultrapure. À partir de ces échantillons d'acides nucléiques, une droite de calibration (cf. Figure 88) est tracée automatiquement par le logiciel d'analyse associé à l'appareil de QPCR en se basant sur les valeurs de Ct obtenues pour chacun des standards.

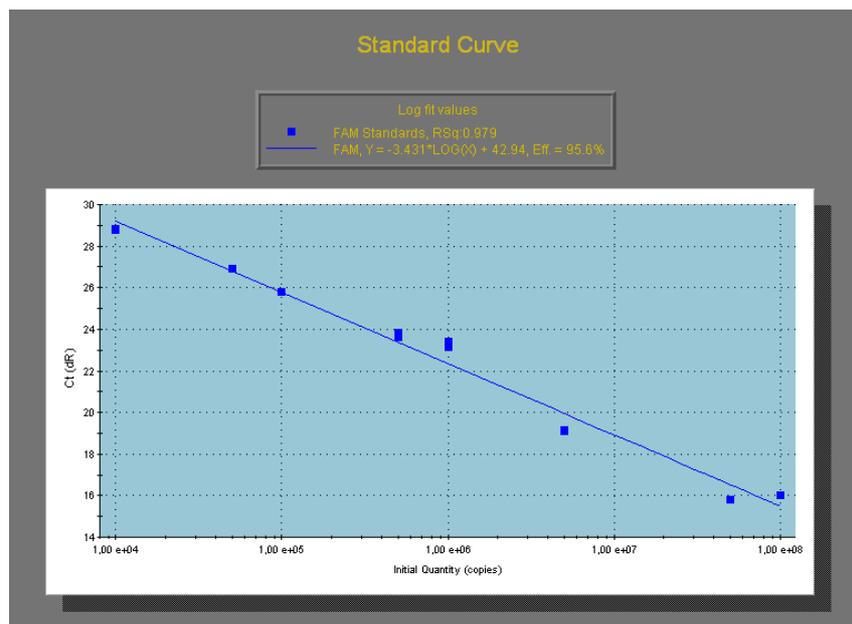


Figure 88 : Courbe de calibration obtenue lors de la quantification de *S. natans* en utilisant les amorces *sthA* FP et *sthA* RP.

Les résultats de quantification obtenus par QPCR ont été comparés avec ceux obtenus par cytométrie en flux. La concentration en cellules d'une nouvelle suspension de bactéries est déterminée par cytométrie en flux. Les ADN sont extraits à partir d'un nombre connu de microorganismes, soit : 1.10^6 , 5.10^6 , 1.10^7 , 5.10^7 et 9.10^7 cellules.mL⁻¹. Des réactions de QPCR sont ensuite réalisées et la concentration en cellules de l'échantillon est déterminée par le logiciel Stratagene MX 4000, en se basant sur la droite standard.

Un exemple de résultats tels qu'ils sont donnés par le logiciel est présenté ci-après (cf. Tableau 18). La colonne "Well Name" correspond au nom de l'échantillon, c'est-à-dire à la concentration en cellules de l'échantillon extrait. La colonne "Dye" indique le fluorophore utilisé pour la réaction de QPCR. Lors de l'utilisation du SYBR Green c'est le marqueur FAM qui est sélectionné. La colonne "Replicate" indique les puits où un même échantillon a été déposé plusieurs fois, c'est notamment le cas des standards pour lesquels la réaction a été réalisée en triplicat. Le "Ct (dRn)" correspond au cycle seuil pour lequel la fluorescence, normalisée par rapport à la fluorescence du fluorophore de référence (Rox), dépasse le bruit de fond. Dans la colonne "Quantity", les valeurs des standards sont précisées par l'utilisateur, et elles correspondent aux concentrations en cellules mesurées par cytométrie en flux avant l'extraction d'ADN. Pour les échantillons inconnus, cette concentration est déterminée par le logiciel en se basant sur la droite standard. La colonne "RSq" (R²), indique le coefficient de détermination. Sa valeur, comprise entre 0 et 1, doit être le plus proche possible de 1. La colonne "Slope" indique la pente de la droite standard.

Well Name	Dye	Well Type	Replicate	Ct (dRn)	Quantity	RSq (dRn)	Slope (dRn)
---	FAM	Standard	1	14,85	1,00E+08	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	1	14,96	1,00E+08	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	1	14,82	1,00E+08	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	2	15,81	5,00E+07	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	2	15,82	5,00E+07	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	2	15,8	5,00E+07	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	3	18,08	1,00E+07	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	3	18,12	1,00E+07	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	3	18,18	1,00E+07	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	4	19,31	5,00E+06	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	4	19,3	5,00E+06	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	4	19,27	5,00E+06	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	5	22,02	1,00E+06	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	5	22,11	1,00E+06	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	5	22,05	1,00E+06	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	6	23,26	5,00E+05	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	6	23,21	5,00E+05	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	6	23,13	5,00E+05	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	7	25,29	1,00E+05	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	7	25,37	1,00E+05	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	7	25,33	1,00E+05	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	8	26,56	5,00E+04	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	8	26,6	5,00E+04	0,995	-3,531
---	FAM	Standard	8	26,57	5,00E+04	0,995	-3,531
9.10 ⁷	FAM	Unknown	---	15,03	8,52E+07	0,995	-3,531
9.10 ⁷	FAM	Unknown	---	15,06	8,49E+07	0,995	-3,531
5.10 ⁷	FAM	Unknown	---	15,72	5,55E+07	0,995	-3,531
5.10 ⁷	FAM	Unknown	---	15,74	5,45E+07	0,995	-3,531
1.10 ⁷	FAM	Unknown	---	18,12	1,15E+07	0,995	-3,531
1.10 ⁷	FAM	Unknown	---	18,04	1,22E+07	0,995	-3,531
5.10 ⁶	FAM	Unknown	---	19,26	5,51E+06	0,995	-3,531
5.10 ⁶	FAM	Unknown	---	19,18	5,46E+06	0,995	-3,531
1.10 ⁶	FAM	Unknown	---	22,09	8,70E+05	0,995	-3,531
1.10 ⁶	FAM	Unknown	---	22,02	8,77E+05	0,995	-3,531
NTC	FAM	NTC	---	No Ct	No Ct	0,995	-3,531
NTC	FAM	NTC	---	No Ct	No Ct	0,995	-3,531

Tableau 18 : Exemple de résultats obtenus lors d'une quantification de *S. natans* en culture pure par QPCR en utilisant les amorces sthA FP et RP. Chacun des échantillons, dont la concentration en cellules a été mesurée au préalable par cytométrie en flux, est marqué d'une couleur différente.

Pour chacun des échantillons, les valeurs obtenues par QPCR sont très proches de celles obtenues par cytométrie en flux (cf. tableau 19).

Quantification par cytométrie en flux (cellule.mL ⁻¹)	Quantification par QPCR (cellules.mL ⁻¹)
9.10 ⁷	8,5.10 ⁷
5.10 ⁷	5,5.10 ⁷
1.10 ⁷	1,18.10 ⁷
0,5.10 ⁷	0,55.10 ⁷
0,1.10 ⁷	0,09.10 ⁷

Tableau 19 : Tableau comparatif des résultats obtenus lors des quantifications par cytométrie en flux et QPCR.

Il existe une bonne corrélation entre les résultats obtenus par les deux techniques puisque les dénombrements par QPCR ne varient pas de plus de 10% par rapport aux valeurs données par la cytométrie en flux. Si l'on tient compte des biais inévitables qui découlent des dilutions et de l'extraction d'ADN, ces résultats sont tout à fait satisfaisants.

1.4.4.3 Quantification de *S. natans* en boues activées

L'étape suivante a été de confronter la technique à une application pratique, à savoir quantifier la bactérie *S. natans* en boues activées. N'ayant pas trouvé de boues activées contenant cette espèce bactérienne, des ajouts dosés de la souche *S. natans* 15291 ont été effectués. Une nouvelle fois, une suspension cellulaire a été quantifiée par cytométrie en flux. Différents volumes de cette suspension ont ensuite été ajoutés à des boues issues d'une station d'épuration de la région parisienne dans laquelle cette bactérie n'a pas été détectée. Les concentrations en *S. natans* des boues ainsi obtenues sont de 5.10^4 , 1.10^5 , 2.10^5 , 5.10^5 , 1.10^6 , 2.10^6 , 5.10^6 et $7,5.10^6$ cellules.mL⁻¹ de boues.

Pour la quantification, une droite standard est réalisée en utilisant les mêmes ADN que pour la quantification en culture pure et chaque point de cette gamme est réalisé en triplicat. Les ADN sont extraits à partir de 250 µL de boues contenant la bactérie *S. natans* à différentes concentrations. Les réactions de PCR sont réalisées sur 3 µL d'ADN en solution, pour les standards et les échantillons (cf. Figure 89).

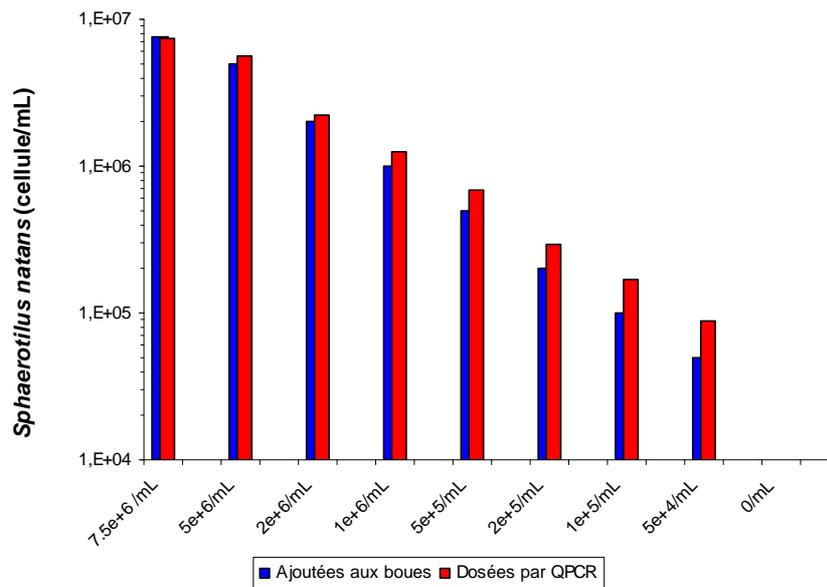


Figure 89 : Histogrammes représentant la quantification par QPCR, de la bactérie *S. natans* 15291 après ajouts dosés dans des boues activées. Quantification par cytométrie en flux (■) et par QPCR (■). Les quantités de bactéries injectées dans les boues sont indiquées en abscisses.

La représentation sous forme d'histogramme permet d'apprécier si les résultats obtenus par PCR quantitative en temps réel sont proches des concentrations en cellules attendues. C'est le cas ici bien que la technique de biologie moléculaire ait tendance à surestimer les populations. Les résultats chiffrés sont donnés dans le Tableau 20 afin de mieux apprécier les écarts.

Concentration en <i>S. natans</i> des boues (cellules/mL)	Quantification par QPCR (cellules/mL)
7,5.10 ⁶	7,4.10 ⁶
5.10 ⁶	5,6.10 ⁶
2.10 ⁶	2,2.10 ⁶
1.10 ⁶	1,3.10 ⁶
0,5.10 ⁶	0,68.10 ⁶
0,2.10 ⁶	0,29.10 ⁶
0,1.10 ⁶	0,17.10 ⁶
0,05.10 ⁶	0,09.10 ⁶

Tableau 20 : Valeurs obtenues lors de la quantification par QPCR de la souche *S. natans* 15291 en boues activées.

Ces valeurs confirment que la technique permet de donner une estimation correcte de la quantité de *S. natans* dans les boues activées. On note cependant que toutes les valeurs obtenues sont supérieures aux quantités introduites. Cette surestimation est d'autant plus importante que la quantité de bactéries introduite au départ est faible. Les extractions d'ADN

ayant été réalisées immédiatement après l'ensemencement, ceci ne peut être le résultat d'une croissance bactérienne, mais pourrait s'expliquer par la présence d'un produit d'amplification supplémentaire à celui attendu, entraînant l'obtention d'un Ct plus précoce. Néanmoins, la courbe de dissociation pour la réaction de PCR avec les amorces du gène *sthA* ne montre qu'un seul pic (cf. Figure 90 A), ce qui traduit la présence d'un produit d'amplification unique. De plus, une électrophorèse sur gel d'agarose a permis de montrer que le fragment d'ADN est bien de la taille attendue (cf. Figure 90 B).

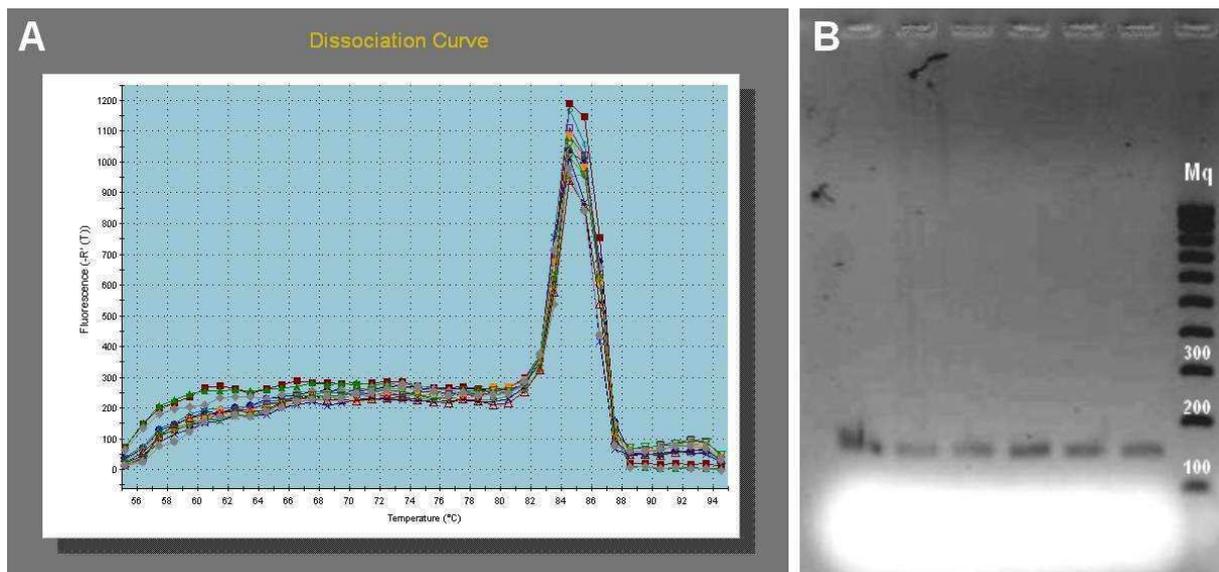


Figure 90 : A) Courbe de dissociation obtenue lors de la réaction de QPCR avec les amorces du gène *sthA* sur les ADN extraits de boues activées enrichies en *S. natans*. B) Électrophorèse sur gel d'agarose 2% des produits d'amplification obtenus lors de cette même réaction de PCR.

Afin de démontrer que la variation de la quantité de *S. natans* observée dans les boues n'est pas simplement due à une variation de la biomasse, la même réaction de QPCR est faite en réalisant simultanément une réaction avec des amorces universelles, le couple 357F/518R, ciblant l'ADNr 16S de la totalité des bactéries.

La comparaison entre la quantification des bactéries totales et de *S. natans* permet de mettre en évidence que les ajouts de la souche 15291 ont un impact négligeable sur la population bactérienne globale. Les diminutions de populations détectées par la technique de QPCR pour *S. natans* 15291 sont bien dues à des variations de l'abondance de la souche et non à une variation de la population bactérienne totale (cf. Figure 91).

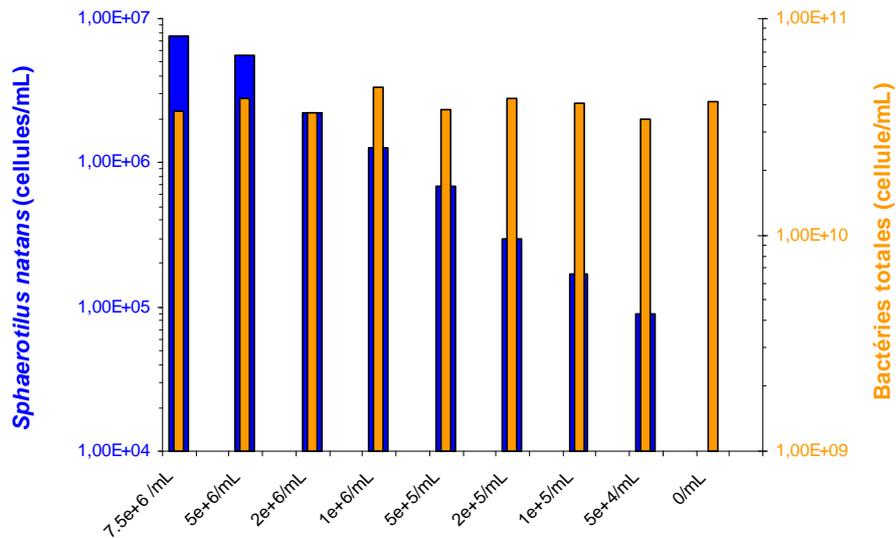


Figure 91 : Histogrammes représentant les quantités de *S. natans* estimées par QPCR dans les boues préalablementensemencées (en bleu), ainsi que la population bactérienne totale dans ces mêmes boues (orange).

Concernant la population bactérienne totale, les valeurs peuvent paraître faibles en regard de la population bactérienne totale habituellement rencontrée dans 1 g de culot de boues activées et qui est de l'ordre de 1.10^{10} bactéries. Ici, les ADN sont extraits à partir de boues non centrifugées. Les populations estimées sont celles présentes dans 1 mL de boues activées non décantées afin de pouvoir les comparer à nos échantillons standards dont la concentration est exprimée en cellules.mL⁻¹.

1.4.4.4 Conclusions

Bien que n'étant pas la cible initialement choisie, le gène *sthA* apparaît comme tout à fait adapté pour la quantification de la bactérie *S. natans* dans des milieux aussi complexes que les boues activées. Une surestimation importante de la population est cependant à noter pour les faibles concentrations en cellules.

Ce gène, très probablement impliqué dans la synthèse de la gaine polysaccharidique entourant le filament, apparaît comme étant très spécifique de l'espèce *S. natans*. En effet, même si la recherche n'a pas été exhaustive, nous n'avons pu trouver trace de sa présence dans aucun des autres génomes bactériens testés, y compris chez différentes souches de *Leptothrix*, phylogénétiquement très proches, ainsi que chez d'autres bactéries filamenteuses gainées et Gram-négatives. Le fait que l'on retrouve ce gène, ou du moins les séquences ciblées par les

différentes amorces testées, uniquement chez *S. natans* pourrait être lié à la composition très originale dans le règne bactérien du polysaccharide constituant 80% de sa gaine. En effet, la synthèse de N-acétylgalactosamine par les bactéries est un phénomène très rare et pourrait être liée à la singularité du gène *sthA*.

L'ADNr 16S est le plus souvent utilisé lorsqu'il s'agit de définir des amorces ou sondes spécifiques d'une espèce bactérienne donnée car cette portion du génome est la plus représentée dans les bases de données. Un gène de fonction peut également être utilisé pour cibler un microorganisme précis. C'est le cas du gène *amoA*, utilisé pour la quantification de la bactérie *Nitrosomonas oligotropha* dans les boues activées (Harms *et al.*, 2003). Le gène *cpn60*, codant pour une sous-unité du complexe protéique GroEL ou Hsp60, peut également être utilisé pour créer des amorces spécifiques d'une espèce bactérienne et caractériser une communauté microbienne issue d'un environnement aussi complexe que des boues activées (Dumonceaux *et al.*, 2006). Cependant, les bases de données sont nettement moins fournies en ce qui concerne les gènes de fonction.

Bien qu'efficace, la technique de quantification par QPCR, présente cependant des biais importants. Le principal est lié à l'utilisation d'une gamme d'étalonnage provenant de dilutions d'une culture pure de *S. natans* préalablement dénombrée par cytométrie en flux. Les biais introduits lors de la quantification par cytométrie en flux, mais surtout lors des dilutions permettant la réalisation de la gamme et des extractions, conduisent à une perte de précision dans le dénombrement de la bactérie cible en boues activées. Un moyen relativement simple à mettre en œuvre et permettant de gagner de façon importante en précision, serait d'utiliser des plasmides ayant incorporé le fragment du gène *sthA* pour réaliser la gamme d'étalonnage.

Cette technique permet d'estimer l'effectif total d'une espèce bactérienne donnée quelle que soit la morphologie adoptée ou son état physiologique. La mise au point d'un panel d'amorces permettant de quantifier les différentes espèces bactériennes permettrait d'obtenir rapidement un profil précis, en termes de diversité et d'abondance, des populations filamenteuses des boues activées. À l'heure actuelle, cette technique de quantification a seulement été appliquée à l'espèce *Microthrix parvicella* (Kaetzke *et al.*, 2005). Ces informations permettraient ainsi d'évaluer les risques de foisonnement filamenteux. La composition de la population bactérienne étant directement en relation avec la composition des eaux usées ou bien encore la disponibilité de l'oxygène, il serait également possible de fournir aux exploitants de stations

d'épuration des informations sur la nature des effluents à traiter, ainsi que sur le bon fonctionnement des systèmes d'aération. La difficulté de mise au point de jeux d'amorces ciblant les différentes bactéries filamenteuses réside principalement dans le fait que ces espèces sont très difficilement cultivables

Outre sa rapidité, cette méthode ne nécessite pas les connaissances et surtout l'expérience nécessaire à une identification basée sur l'observation des critères morphologiques. De plus, cette méthode de quantification moins fastidieuse permet de s'affranchir de biais inhérents à la technique FISH.

1.5 Étude de l'expression protéique des formes monocellulaire et filamenteuse de *S. natans*

La mise au point d'un moyen efficace de lutte contre le phénomène de prolifération filamenteuse, passe inévitablement par la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à cette forme particulière de croissance et l'identification des molécules impliquées. Dans cette optique, une étude de l'expression protéique globale de *S. natans* sous formes monocellulaire et filamenteuse a été réalisée.

L'objectif premier a été d'étudier la composition et la structure de la gaine et d'identifier les protéines intervenant dans sa synthèse ou sa déstructuration du filament.

1.5.1 Étude du polysaccharide de la gaine de *S. natans*

Un protocole permettant la purification de la gaine¹ a été mis au point. Il est basé sur celui défini par Takeda et *al.* (2002b). Les étapes de traitement à l'autoclave ont ici été remplacées par des étapes à des températures inférieures (60°C), mais sur de plus longues durées (trois heures au lieu d'une). En effet une exposition du polysaccharide et des protéines à des températures de l'ordre de 120°C entraînerait une réaction chimique, appelée réaction de Maillard, entre des sucres réducteurs (glucose et N-acétylgalactosamine) et des peptides. Ceci pourrait conduire à une altération des molécules étudiées et donc à une mauvaise interprétation des résultats.

¹ Le protocole d'extraction et de purification de la gaine de *S. natans* est détaillé dans l'annexe 10.

Lors d'expérimentations préalables, un moyen de solubiliser le polysaccharide purifié a été défini. Après différents essais, à l'aide d'ultrasons, de SDS, ou encore de solutions basiques (NaOH) ou acide (HCl), il s'est avéré que seul un traitement au β -mercaptoéthanol aboutissait à une solubilisation complète de la gaine lyophilisée. Cette molécule va provoquer la réduction des ponts disulfures au niveau des protéines. Les protéines présentes au sein de la gaine jouent donc un rôle essentiel dans sa cohésion, notamment grâce aux ponts disulfures entre les cystéines.

Les analyses biochimiques portant sur la composition et la structure du polysaccharide, ainsi que sur la protéine de la gaine de *S. natans* n'ont pas pu être menées à leur terme au cours de cette thèse.

1.5.2 SDS-PAGE

La première étape dans l'étude de l'expression des protéines pour *S. natans* en fonction de sa morphologie a été de déterminer le profil d'expression globale des protéines de ces deux formes en utilisant la technique SDS-PAGE. Cette technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes, décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes, permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. L'extraction des protéines totales est réalisée en suivant le protocole décrit par Laemmli (1970) et décrit dans le chapitre précédent. Les protéines sont ensuite dosées à l'aide du système Qubit et du kit Quant-iTTM Protein Assay (Invitrogen-Molecular probes). Les séparations SDS-PAGE sont alors réalisées à partir de 10 μ g d'extraits protéiques. Les conditions de migration sont précisées dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Les protéines totales sont extraites à partir de cultures de la bactérie sous forme dispersée et filamenteuse de trois souches différentes de *S. natans* : 13338T, 15291 et 29329. La souche 13929 étant difficile à obtenir sous forme monocellulaire, elle n'a pas été incluse dans cette étude. De même, la souche 29330 se développant quasiment uniquement sous forme monocellulaire, la différence d'expression protéique entre ses deux formes n'a pas pu être étudiée. Les profils d'expression protéique de ces souches ont ensuite été analysés par SDS-PAGE. (cf. Figure 92).

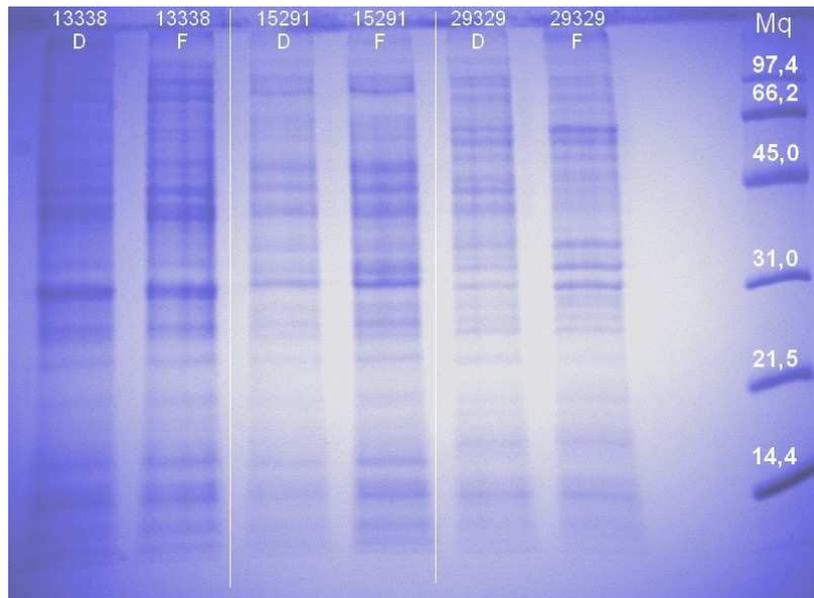


Figure 92 : Profils de migration électrophorétique obtenue en SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, et après coloration au bleu de Coomassie, des protéines totales extraites de culture des souches *S. natans* 13338T, 15291 et 29329 sous leurs formes dispersée (D) et filamenteuse (F). Mq : Marqueur de masses moléculaires (en kDa).

Les profils des différentes souches, bien qu'ayant un grand nombre de bandes en commun, présentent également de nombreuses différences. Les profils des souches 13338T et 15291 semblent assez proches, alors que celui de la souche 29329 présente un certain nombre de bandes spécifiques. Ces premières observations semblent aller dans le même sens que celles faites lors de l'étude des morphologies adoptées en fonction des conditions de culture (disponibilité de l'oxygène et concentration en nutriments). Nous avons à ce moment là constaté que les souches 13338T et 15291 adoptaient des morphologies relativement semblables dans des mêmes conditions de culture, alors que la souche 29329 se comportait différemment, ne se développant que rarement sous forme de filaments. Ces divergences de comportement pourraient donc provenir d'une variation de l'équipement enzymatique, ce qui expliquerait également les différences entre les profils électrophorétiques obtenus par SDS-PAGE.

Des variations entre les deux morphologies sont également observées pour chacune des souches. Les profils des bactéries sous forme filamenteuse apparaissent plus complexes dans leur composition en protéines. Cependant, les seules informations que fournissent ces gels sont que des protéines sont différemment exprimées selon la morphologie adoptée par la bactérie.

Dans un second temps, les protéines totales ont été extraites à partir de cultures de la souche *S. natans* 15291 uniquement sous forme monocellulaire, filamenteuse, et à partir d'une culture issue de filaments dont la transition vers la forme monocellulaire a été induite par un transfert sur gélose NB 1% 48 heures avant extraction des protéines. Nous qualifierons cette culture de bactéries en cours de défilamentation. Les protéines extraites à partir de la gaine purifiée ont également été analysées par SDS-PAGE (cf. Figure 93). En effet cette dernière a été décrite comme étant composée de 27% de protéines (Takeda *et al.*, 1998) qui jouent un rôle essentiel dans sa structuration, comme cela a été montré par le traitement au β -mercaptoéthanol. Takeda *et al.* (1998), ont mis en évidence que ces protéines sont composées à près de 25% de cystéine qui jouent donc un rôle central dans la structuration de la gaine. L'identification de ces protéines permettrait d'avancer dans la compréhension de la construction de la gaine polysaccharidique et donc dans le mécanisme de formation des filaments de *S. natans*.

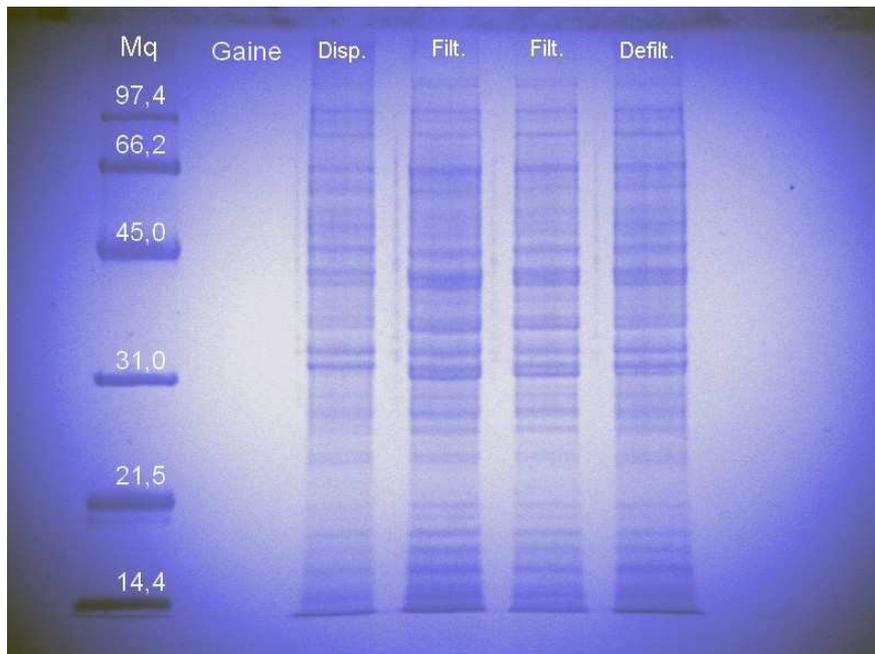


Figure 93 : Profils de migration électrophorétique, en SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, des protéines totales extraites de culture de *S. natans* 15291 sous forme dispersée (Disp.), filamenteuse (Filt.), et en cours de défilamentation (Defilt.), ainsi que de la gaine purifiée de *S. natans* (Gaine). Mq : marqueur de masses moléculaires (en kDa).

Comme cela a été constaté lors de l'analyse SDS-PAGE des protéines extraites des formes dispersée et filamenteuse des trois souches de *S. natans*, le profil de la souche 15291 sous forme de filaments semble plus riche que celui de la forme monocellulaire. De nombreuses bandes semblent beaucoup plus intenses dans cet état morphologique. La région du gel

comprenant les protéines ayant une masse moléculaire comprise entre 31 et 66 kDa est la mieux résolue et semble être celle présentant le plus de différences entre les deux états.

Le profil d'expression des protéines extraites de la culture en cours de défilamentation est très semblable à celui de la bactérie sous forme filamenteuse (cf. Figure 93). Quelques bandes semblent varier légèrement en intensité, mais les profils globaux sont similaires. Ceci peut s'expliquer par le fait que 48 heures après le transfert des filaments sur la gélose, une forte population de cellules dispersées est apparue mais de nombreux filaments sont toujours présents. L'objectif de l'étude du protéome des bactéries se situant dans une transition entre l'état filamenteux et l'état monocellulaire est de mettre en évidence des enzymes capables de dégrader ou de déstructurer la gaine polysaccharidique entourant le filament.

Aucun profil n'est visible pour l'échantillon protéique extrait de la gaine purifiée car nous ne disposions que de peu de matériel de départ : 1,5 g de gaine ont été purifiés et lyophilisés à partir de 5 litres de cultures. D'autres analyses devant également être réalisées, les protéines ont été extraites à partir de seulement 100 mg de gaine lyophilisée. De plus, le polysaccharide étant très difficilement soluble, l'extraction des protéines a été délicate et son rendement très faible. Une révélation des bandes à l'aide d'une coloration plus sensible que le bleu de Coomassie tel que l'argent, aurait sûrement permis d'obtenir une meilleure résolution des gels.

1.5.3 Analyse LC-MS-MS

La seconde étape de l'analyse de l'expression protéique a été de définir quelles étaient les protéines dont l'expression variait entre les deux morphologies adoptées par la bactérie. La technique choisie pour les identifier est la spectroscopie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide haute performance (LC-MS-MS). Les analyses ont été réalisées sur les extraits protéiques issus de la souche *S. natans* 15291.

1.5.3.1 Analyses des protéomes totaux des formes dispersée et filamenteuse

Dans un premier temps, des analyses de LC-MS-MS ont été réalisées sur les protéines totales issues de cultures sous forme filamenteuse et dispersée. L'objectif était de mettre en évidence une différence au niveau de l'expression protéique entre les deux formes.

Une analyse SDS-PAGE avec une migration électrophorétique très courte est réalisée pour les deux extraits protéiques, afin de n'obtenir qu'une bande large regroupant le protéome total. L'ensemble des protéines ainsi détecté au Bleu de Coomassie est hydrolysé à partir du gel. Une analyse par LC-MS-MS est ensuite réalisée selon le protocole décrit précédemment.

L'analyse des peptides identifiés par spectrométrie de masse est réalisée en utilisant le logiciel Peaks (Bioinformatics Solutions Inc.). L'analyse par cartographie peptidique consiste à confronter les peptides identifiés par spectrométrie à une banque constituée de toutes les séquences protéiques de β -protéobactéries disponibles. Par cette méthode, les protéines identifiées pour les formes monocellulaire et filamenteuse sont respectivement au nombre de 73 et 71. Ces valeurs sont de très loin inférieures au nombre de protéines réellement exprimées par la bactérie. De plus, seulement 42 protéines pour la forme filamenteuse et 41 pour la forme dispersée ont été identifiées de façon certaine, c'est-à-dire par l'identification d'au moins deux peptides^m.

La plupart des protéines identifiées sont les mêmes quelle que soit la morphologie considérée. Il s'agit de protéines très conservées et intervenant dans le métabolisme de base des cellules. Ce sont principalement des protéines ribosomiques, des enzymes du cycle de Krebs, des facteurs de transcription ou bien encore des protéines intervenant dans la synthèse de l'ATP. Ces résultats nous permettent de constater que sans une séparation efficace en amont, les extraits protéiques sont trop complexes pour une séparation des peptides par simple dimension, de type NanoLC. Pour identifier plus de protéines, directement à partir des extraits protéiques bruts, il faudrait mettre en place une séparation multi-chromatographique du mélange peptidique préalablement à l'analyse par LC-MS-MS.

Une seconde stratégie a donc été employée pour identifier des protéines différemment exprimées entre les deux morphologies de *S. natans*. Des bandes d'intensités différentes ont été découpées à partir de gels SDS-PAGE et analysées en LC-MS-MS.

^m La liste des protéines identifiées pour les formes dispersée et filamenteuse est disponible en annexes 11 et 12.

1.5.3.2 Analyse des bandes SDS-PAGE

Cinq bandes dont les variations d'intensité sont très importantes entre les deux états morphologiques ont été sélectionnées sur un gel SDS-PAGE (cf. Figure 94).

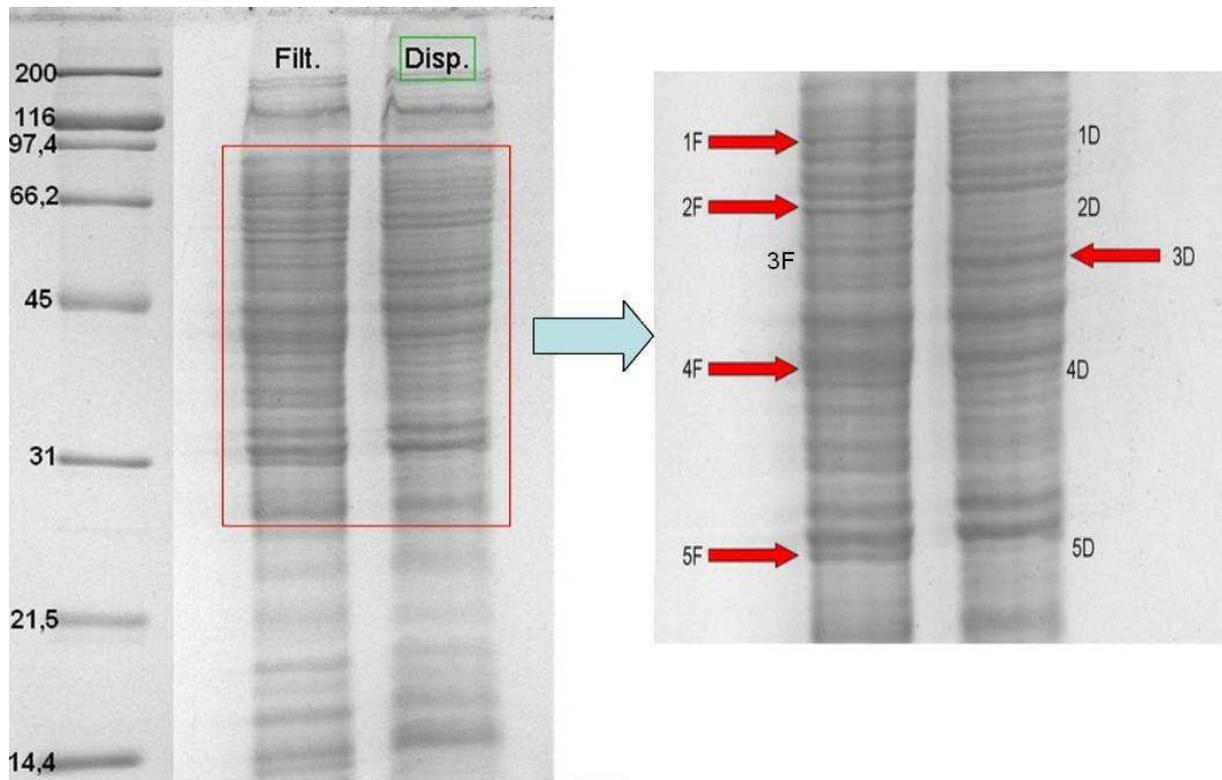


Figure 94 : Photographie du gel dénaturant SDS-PAGE, 10 % acrylamide pour les extraits protéiques de *S. natans* 15291 sous forme filamenteuse (Filt.) et dispersée (Disp.), et positionnement des 5 bandes découpées et ultérieurement analysées en LCMSMS. La lettre correspond à la morphologie des bactéries à partir desquelles les protéines ont été extraites, F : Filament et D : dispersées. Les unités du marqueur de poids moléculaire sont exprimées en kDa. Les flèches indiquent la morphologie pour laquelle la bande découpée est la plus intense.

Les bandes 1, 2, 4 et 5 sont beaucoup plus intenses pour la forme filamenteuse que pour la forme dispersée. Au contraire, la bande 3 est plus intense pour la forme dispersée que pour la forme filamenteuse (cf. Figure 94).

Ces bandes ont été découpées sur les deux profils protéiques de *S. natans*. Les protéines contenues ont été extraites puis digérées par la trypsine. Ces extraits protéiques ont ensuite été analysés par LC-MS-MS en suivant le protocole décrit dans le chapitre précédent. Les peptides déterminés ont été analysés à l'aide du logiciel Bioworks Browser 3.3 (Thermo Electron) et l'algorithme Sequest. Le niveau d'expression des protéines identifiées a également été déterminé pour chacune des bandes par la technique dite de "spectral counting".

Elle permet de comparer le niveau d'expression d'une même protéine dans deux échantillons différents, en se basant sur le nombre de spectres et le nombre de peptides identifiés lui correspondant. Nous avons ainsi pu comparer le niveau d'expression des protéines identifiées dans une même bande correspondant à *S. natans* sous forme filamenteuse et dispersée.

Pour chaque paire de bandes découpée du gel SDS-PAGE, plus d'une dizaine de protéines en moyenne ont été identifiées : 17 pour les bandes 1F et 1D, 18 pour les bandes 2F et 2D, 14 pour les bandes 3F et 3D, 20 pour les bandes 4F et 4D, et enfin 13 pour les bandes 5F et 5D. Seulement certaines d'entre elles sont exprimées de façon différente par les deux formes de *S. natans* (cf. Tableau 21).

Protéines exprimées essentiellement par la forme filamenteuse	Protéines exprimées essentiellement par la forme monocellulaire
Bande 1F - Protéine de la division cellulaire FtsH (7/0) ⁿ - Protéine Kinase de type transférase (20/4) - 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (9/0) - Acétolactate synthase (7/0) - Enzyme de liaison à la thiamine pyrophosphate (TPP) (8/0) - Protéine chaperonne DnaK (6/0)	Bande 1D
Bande 2F - Protéine soluble de liaison extracellulaire de la famille 1 (30/6)	Bande 2D - Glutamate –ammonia ligase (0/4) - Glucose-6-phosphate isomerase (0/5) - Polynucleotide adényltransferase (0/4)
Bande 3F - Adenosylhomocysteinase (29/4) - Sulfate-adenyltransferase (6/0) - γ -glutamyl phosphate reductase (4/0) - glutamate-cystéine ligase (4/0)	Bande 3D - Arginosuccinate lyase (0/6) - Peptidase U62, (0/4) - Sous-unité β de l'ATP synthase F1 (0/26) - Facteur de terminaison de la transcription Rho (3/19) - Isocitrate lyase (3/14)
Bande 4F - Chaîne α de la Succinyl-CoA synthetase (13/0) - Malate déshydrogénase (5/0) - Protéine soluble de liaison extracellulaire de la famille 3 (5/0) - Aminotransférase d'acide aminé à chaîne ramifiée (4/0) - Facteur d'élongation EF-Tu (4/0) - Endonucléase AP de la famille 2 (7/0)	Bande 4D - Succinate déshydrogénase (0/6) - Facteur d'élongation P (0/5) - Protéine de liaison périplasmique/facteur de transcription LacI (0/4)
Bande 5F - Protéine de liaison périplasmique (10/2) - Protéines de la chaîne de transport d'électron (5/0)	Bande 5D - Protéine chaperonne GroEL (2/11) - Dihydrodipicolinate réductase (0/6)

Tableau 21 : Protéines surexprimées dans les formes monocellulaire et filamenteuse de *S. natans*.

Les protéines considérées comme plus exprimées dans un cas ont un nombre de spectres caractéristique de la protéine au moins quatre fois supérieur à celui de l'autre morphologie de la bactérie *S. natans*.

ⁿ (Nombre de spectres obtenus pour la forme filamenteuse/Nombre de spectre obtenus pour la forme dispersée).

Si on les classe en fonction de leur activité physiologique, ces protéines appartiennent principalement à six groupes.

- Les enzymes du métabolisme énergétique :

- ✓ *Enzymes du cycle de Krebs :*

L'isocitrate lyase, l'arginosuccinate lyase et la glucose-6-phosphate isomérase sont des enzymes intervenant dans le cycle de Krebs qui sont surexprimées lorsque *S. natans* adopte la forme monocellulaire. Au contraire, l'aconitate hydratase, la succinyl-CoA synthétase et la malate déshydrogénase sont plus exprimées lors de la croissance filamenteuse.

- ✓ *Enzymes de la glycolyse :*

Une enzyme intervenant dans la glycolyse, la kinase de type PfkB, spécifique des sucres a été identifiée comme étant surexprimée lors de la croissance de la bactérie sous forme filamenteuse. L'acétolactate synthétase, enzyme intervenant dans la formation de l'acide lactique à partir du pyruvate, produite lors de la glycolyse est aussi plus exprimée par les filaments.

- ✓ *Oxydation des acides gras :*

Deux enzymes intervenant dans le mécanisme de β -oxydation permettant la dégradation des acides gras, sont plus exprimées chez le filament. Il s'agit de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et d'une enzyme de liaison à la Thiamine pyrophosphate.

La filamentation est ici induite par le transfert des bactéries dans un milieu très pauvre, le microorganisme va donc devoir mettre en œuvre les différents mécanismes à sa disposition pour produire de l'énergie. La β -oxydation est la seule façon de produire de l'énergie à partir des acides gras (Stoffel & Caesar, 1965). La glycolyse permet d'obtenir de l'ATP par dégradation du glucose (2 molécules d'ATP pour 1 molécule de glucose) sans consommation d'oxygène, voie qui peut donc être favorisée lors d'une carence en oxygène et pouvant aboutir à la filamentation de *S. natans*.

- Les protéines impliquées dans la division cellulaire :

Parmi les protéines les plus intéressantes ayant été identifiées lors de cette analyse, se trouvent les protéines directement impliquées dans la division cellulaire.

✓ *Protéine chaperonne GroEL :*

Les analyses ont permis de mettre en évidence que cette protéine est plus exprimée chez *S. natans* sous forme monocellulaire. Cette enzyme, équivalente de Hsp60 chez les eucaryotes, est une protéine dite chaperonne, c'est-à-dire qu'elle participe à la maturation d'autres protéines en leur assurant un repliement tridimensionnel adéquat (Martin, 1997). Ce type de protéine est exprimé lors des situations de stress, et notamment lors d'une exposition aux hautes températures. C'est pour cette raison que ce type de protéine est également désigné sous le terme de protéines de choc thermique ou "Heat-Shock Proteins" (Hsp). Elle intervient aussi dans le phénomène de division cellulaire en interagissant avec la protéine FtsZ (Ogino *et al.*, 2004), indispensable à l'étape de cytodivision (Wehrl *et al.*, 2000). Elle appartient à une famille de protéines codées par un ensemble de gènes qui, lorsqu'ils sont mutés, entraînent une altération de la division cellulaire et une croissance des cellules sous forme de filaments. On parle donc de protéines "Filamentous thermo-sensitive" ou Fts. Cette protéine forme un anneau au niveau du site du futur septum, permettant ensuite la contraction et la division de la membrane.

Ainsi des bactéries *E. coli* mutantes pour les protéines GroEL et GroES se développent sous forme de filaments (Fujiwara & Taguchi, 2007). Il est donc tout à fait probable que GroEL joue un rôle important dans le mécanisme de filamentation chez *S. natans*.

✓ *Protéine FtsH :*

Cette protéine est, à la différence de la précédente, plus exprimée lorsque la bactérie se développe sous forme de filaments. Elle est également directement impliquée dans le phénomène de division cellulaire. C'est une protéase de type AAA qui va hydrolyser spécifiquement FtsZ et ainsi empêcher la division de la membrane cellulaire (Begg *et al.*, 1992). Le rôle *in vivo* de FtsH est de contrôler le taux de FtsZ dans la cellule et par conséquent de réguler la division cellulaire. L'induction d'une surexpression de cette protéine chez *E. coli* provoque la croissance de la bactérie sous forme de filaments (Itoh *et al.*, 1999).

- Les protéines de stress :

Les protéines dites de stress sont souvent assimilées aux protéines Hsp, mais d'autres protéines sont également synthétisées par les microorganismes lors de situations critiques. Certaines d'entre elles ont été identifiées comme ayant un niveau d'expression différent entre les formes filamenteuse et monocellulaire de *S. natans*.

- ✓ *Peptidase U62 :*

C'est l'unique protéine de stress identifiée qui soit plus exprimée par la forme monocellulaire de la bactérie. Elle intervient dans le mécanisme de réplication de l'ADN où elle joue un rôle de modulateur de l'ADN gyrase. Cette enzyme favoriserait la réplication de l'ADN en empêchant l'interaction entre la sous-unité A de l'ADN gyrase et une molécule inhibitrice de son activité.

Les protéines de stress suivantes sont toutes plus exprimées par la forme filamenteuse de *S. natans*.

- ✓ *La DnaK :*

Cette protéine chaperonne qui correspond à Hsp70 des eucaryotes, participe au processus d'assemblage des ribosomes (Sbai & Alix, 1998). Elle est aussi requise pour la croissance des microorganismes en conditions de stress en favorisant la réplication de l'ADN lors d'une exposition des bactéries à de hautes températures (Hwang *et al.*, 1990).

- ✓ *AP endonucléase :*

Cette enzyme intervient dans le mécanisme de réparation de l'ADN. Elle clive alors l'ADN au niveau d'un site abasique, aussi appelé site AP (apurique/apyrimidique), ce qui correspond à une coupure de la molécule d'ADN. L'ADN polymérase I et l'ADN ligase entrent ensuite en action, pour remplacer les bases excisées. Les endonucléases AP sont donc surtout exprimées lors des situations de stress où la molécule d'ADN risque de subir des dommages importants.

✓ *Le facteur d'élongation EF-Tu :*

Cette protéine est indispensable à l'élongation de la chaîne polypeptidique lors de la traduction des protéines en interagissant directement avec le ribosome (Kaziro, 1978; Krab & Parmeggiani, 2002). Elle permet de réguler la croissance bactérienne et est souvent exprimée en réponse à un stress tel qu'un déficit en nutriments.

• Les protéines intervenant dans la synthèse d'acides aminés :

Une expression différente entre les formes monocellulaire et filamenteuse de *S. natans* a été définie pour de nombreuses protéines intervenant dans la voie de synthèse des acides aminés.

✓ *Dihydrodipicolinate réductase :*

C'est la seule enzyme impliquée dans la synthèse d'acides aminés parmi celles identifiées, à être plus exprimée dans la forme dispersée de la bactérie. Elle intervient dans la voie de synthèse de la lysine, acide aminé essentiel dans la composition de la paroi bactérienne. De nombreuses protéines ayant un rôle central dans le mécanisme de division cellulaire interagissent directement avec la paroi, et notamment avec les peptidoglycanes qui la composent (Morlot *et al.*, 2004).

Les enzymes intervenant dans la synthèse d'acides aminés qui vont maintenant être décrites sont toutes exprimées de façon plus importante dans la forme filamenteuse de *S. natans*.

✓ *La Sulfate adényltransférase :*

Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de la cystéine. Elle entre en jeu au niveau de la première étape de la voie d'assimilation du sulfate, lequel va ensuite servir à la synthèse de l'acide aminé en question à partir d'*O*-acétylsérine.

✓ *L'Adénosylhomocystéinase :*

Cette enzyme permet la formation d'homocystéine, qui est un homologue de la cystéine, à partir de S-adénosylhomocystéine. L'homocystéine diffère de la cystéine par l'ajout d'un carbone (-CH₂-) avant le groupement thiol (-SH). Cet acide aminé soufré peut également servir, en utilisant une voie secondaire, de source de cystéine pour le microorganisme, la

condensation de l'homocystéine avec la sérine aboutissant à la formation de cystéine et d' α -cétobutyrate.

La cystéine est un des principaux acides aminés constitutifs des protéines de la gaine de *S. natans*. Il représente en effet près de 25% des acides aminés identifiés à partir des extraits de gaine purifiée (Takeda *et al.*, 1998). Comme nous avons pu le constater précédemment, la cystéine semble jouer un rôle essentiel dans la structure de cette gaine polysaccharidique. Il n'est donc pas surprenant que les protéines impliquées dans sa voie de synthèse soient surexprimées lors de la filamentation.

✓ *La γ -glutamyl phosphate réductase :*

Cette enzyme intervient dans la synthèse de la proline, mais elle est également impliquée dans le cycle de l'urée et le métabolisme des groupements aminés car elle engendre la production de glutamate-5-semi-aldéhyde.

✓ *La Glutamate cystéine ligase :*

Cette protéine est généralement produite en réponse à un stress oxydatif. Elle est en effet à l'origine de la formation du glutathion, qui est un puissant antioxydant et qui permet l'entrée des acides aminés dans la cellule. Il est formé par des 3 principaux acides aminés retrouvés au niveau de la gaine polysaccharidique de *S. natans* : glycine (50%), cystéine (25%) et glutamate (6,4%).

✓ *L'Aminotransférase d'acide aminé à chaîne ramifiée :*

Cette enzyme intervient dans la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée, c'est-à-dire la leucine, l'isoleucine et la valine, qui représentent 3,8% des acides aminés décrits dans les extraits de gaine purifiée.

Ces différentes enzymes identifiées pour la forme filamenteuse de *S. natans* sont celles participant à la synthèse des acides aminés les plus abondamment retrouvés dans la gaine entourant le trichome de la bactérie. La croissance filamenteuse réclamant la synthèse d'une importante quantité de gaine, il serait logique que la production de ces acides aminés soit augmentée lors de la croissance filamenteuse.

- Les protéines de la néoglucogenèse :

La néoglucogenèse correspond à la synthèse de glucose par le microorganisme à partir de précurseurs non-glucidiques. C'est en quelque sorte le phénomène inverse de la glycolyse. Plusieurs voies sont possibles en fonction du précurseur utilisé (acides aminés, pyruvate, lactate ou glycérol). Deux enzymes intervenant dans la synthèse de glucose par la voie du pyruvate sont exprimées de façon plus importante par la forme filamenteuse de *S. natans*.

- ✓ *La Phosphoénol-pyruvate carboxykinase (PEPCK) :*

Si la néoglucogenèse partage un grand nombre d'enzymes avec la réaction de glycolyse mais dans le sens inverse, la PEPCK est une enzyme clé et spécifique de cette réaction. Elle permet la transformation de l'oxaloacétate en Phosphoénol pyruvate (PEP). C'est à partir de cette molécule que la voie de la glycolyse est empruntée jusqu'à la synthèse d'une molécule de glucose.

- ✓ *Malate déshydrogénase :*

À la différence de la PEPCK, la malate déshydrogénase intervient à la fois dans la glycolyse et la néoglucogenèse. Elle catalyse la conversion du malate en oxaloacétate. Étant donné que nous avons mis en évidence la présence de la PEPCK, et donc de la voie de la néoglucogenèse, elle est ici classée comme appartenant à la voie de biosynthèse du glucose.

Le fait que des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du glucose soient exprimées dans les bactéries ayant adoptées la forme filamenteuse et ne soient pas retrouvées chez les microorganismes dispersés peut être lié à la synthèse de la gaine entourant le filament. En effet, elle est composée à 20% de glucose et à 80% de N-acétylgalactosamine. Une production importante du polysaccharide nécessite donc de la part du microorganisme une grande quantité de glucose, ce qui pourrait expliquer l'activation de la voie de néoglucogenèse. Il ne faut cependant pas perdre de vue que seule une très faible fraction du protéome a été analysée.

- Les protéines de transport :

Le dernier groupe de protéines exprimées de façon différente entre les formes dispersée et filamenteuse de la bactérie correspond aux protéines de transport, et notamment à celles

transportant les sucres. Toutes ces protéines sont exprimées de façon plus importante pour la forme filamenteuse de *S. natans*.

✓ *Protéine de liaison périplasmique/facteur de transcription LacI :*

Cette protéine est avant tout un facteur ayant un rôle inhibiteur de la transcription. Sa liaison à un sucre va changer sa conformation, notamment au niveau du site de liaison à l'ADN, et lever cette répression. Cette molécule va avoir parallèlement un rôle de transporteur de sucres, en particulier du Rhamnose, du D-fructose et du D-Xylose.

✓ *Récepteurs solubles extracellulaires de la famille 1 et 3 :*

Ces protéines ("extracellular solute-binding protein") jouent des rôles multiples au sein de la cellule : chémorécepteurs, récepteurs pour les systèmes de transport, ou encore initiateurs de signaux de transduction de certaines voies métaboliques. Environ 50 protéines de ce type ont été identifiées pour les bactéries Gram-négatives. Les protéines appartenant à la famille 1 sont impliquées dans le transport d'oligosaccharides. Celles appartenant à la famille 3 reconnaissent spécifiquement les acides aminés polaires que sont l'histidine, la lysine-arginine-ornithine, et la glutamine, ainsi que les acides aminés basiques (Tam & Saier, 1993).

Ces différentes protéines impliquées dans le transport de molécules, ont toutes pour cibles des molécules entrant dans la composition du polysaccharide de la gaine ou bien l'EPS entourant le filament. En ce qui concerne les récepteurs solubles extracellulaires, ils participent au transport de polysaccharides, ainsi que de la lysine et de la glutamine qui sont des acides aminés entrant dans la composition de la gaine. La protéine de liaison périplasmique/facteur de transcription LacI participe au transport du rhamnose, qui entre à 50% dans la composition de l'EPS retrouvé autour du filament.

1.5.4 Conclusions, limitations de la technique et perspectives

Cette étude de l'expression des protéines des formes monocellulaire et filamenteuse de *S. natans* reste une première approche. En effet l'analyse n'a été effectuée que sur cinq paires de bandes issues du profil de migration SDS-PAGE et présentant les variations d'intensité les plus prononcées entre les deux morphologies. Elle fournit cependant de nouvelles pistes quant à d'éventuelles molécules cibles intervenant plus ou moins directement dans le phénomène de filamentation.

D'après les profils SDS-PAGE, il semblerait qu'une plus grande variété de protéines soit retrouvée chez la forme filamenteuse de la bactérie. Sur les cinq bandes du gel étudiées, une seule est plus intensément marquée pour la forme monocellulaire de *S. natans*. En général, les protéines qui sont plus fortement exprimées lorsque le microorganisme adopte cette morphologie sont impliquées dans le phénomène de division cellulaire, comme par exemple la peptidase U62 qui induit le phénomène de réplication de l'ADN.

En ce qui concerne les protéines plus exprimées par les filaments que par la forme dispersée, un grand nombre d'entre elles semblent en rapport avec la gaine polysaccharidique entourant le trichome de *S. natans*. La protéine correspondant au gène *sthA* n'a pas pu être mise en évidence par cette méthode. D'après sa composition en acides aminés, elle devrait avoir une masse moléculaire d'environ 52 kDa, et devrait donc se situer juste au dessus de la bande 3 découpées à partir du gel. Cependant, plusieurs enzymes identifiées semblent en lien direct avec la synthèse de cette gaine. Certaines entrent directement dans la voie de synthèse des principaux acides aminés qui composent sa fraction protéique et en particulier de la cystéine, qui correspond à elle seule à 25% des acides aminés présents dans celle-ci. Un autre élément important est la présence d'enzymes impliquées dans la néoglucogenèse, réaction aboutissant à la synthèse de glucose par le microorganisme. Cet élément semble en accord avec le fait que lors de la synthèse du polysaccharide constitutif de la gaine, une grande quantité de cet ose doit être mobilisée par la bactérie puisqu'il représente 20% des sucres entrant dans sa composition. Toujours dans le même sens, des protéines de transport de sucres ou de polysaccharides ont également été identifiées pour la forme filamenteuse de *S. natans*. Enfin un grand nombre de protéines dites de stress ont été retrouvées, ce qui est logique car la filamentation est une forme de réponse de la bactérie à une situation de carence.

Ces résultats permettent de fournir de nouvelles pistes concernant les protéines directement impliquées dans le mécanisme moléculaire régissant la croissance sous forme filamenteuse de *S. natans*. Une étude plus approfondie de ces dernières, ainsi que l'identification d'autres enzymes pourra permettre de définir de façon plus précise les mécanismes moléculaires régissant la formation du filament, ou de déterminer comment des cellules dispersées provenant d'un filament peuvent recoloniser le milieu lors d'un changement des conditions environnementales. L'aspect limitant auquel s'est heurtée notre démarche d'identification, est que notre microorganisme cible est très peu connu, comme la majorité des microorganismes de l'environnement. Son génome n'est actuellement pas séquencé, et très peu de séquences

nucléotidiques s'y référant sont publiées. Seulement 31 séquences concernant *S. natans* sont référencées sur GenBank, et elles ne correspondent en fait qu'à 4 séquences différentes de son génome. De ce fait l'analyse par empreinte peptidique est très délicate, et seules les protéines les plus conservées et les plus abondantes dans l'échantillon pourront être mises en évidence. En effet un peptide ne présentant une variation que d'un seul acide aminé avec une séquence référencée dans la base de données ne peut être reconnu comme présentant une similarité.

Les différences entre les profils protéiques obtenus pour les morphologies dispersée et filamenteuse montrent une évolution dans la physiologie de la cellule. Mais il faut cependant noter que dans ce cas seul les deux états morphologies distinctes de la bactérie ont été étudiés. Mais la filamentation est en réalité un phénomène progressif (Cf. Figure 95) dont la séquence théorique des évènements a été décrite précédemment (cf. pages 165-166).

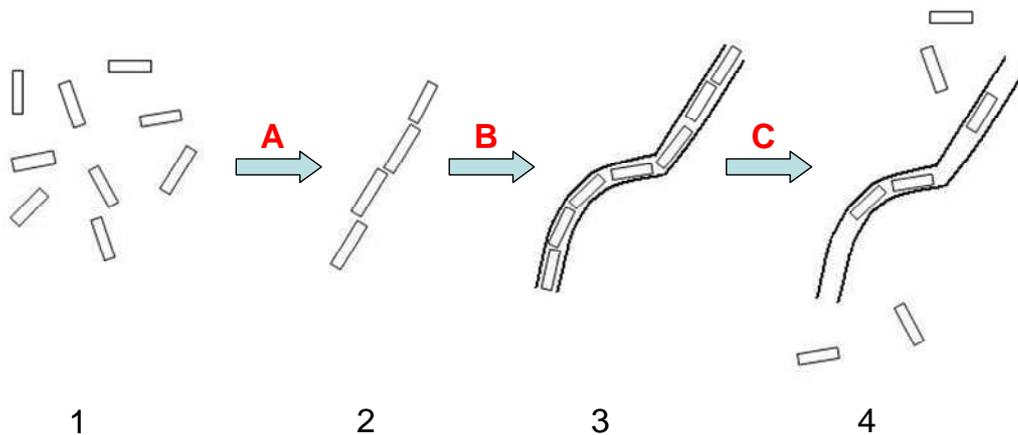


Figure 95: Schéma illustrant les principales étapes de la formation du filament à partir de *S. natans* sous forme dispersée, et la recolonisation du milieu par les effectifs monocellulaires.

En fonction du stade dans lequel se trouvent les microorganismes, l'équipement enzymatique dont dispose la cellule peut se révéler très différent. Un certain nombre de protéines cibles peuvent être envisagées en fonction des besoins de la cellule pour chacune de ces situations.

- 1 : protéines liées à la mobilité des cellules, aux flagelles
- 2 : protéines de stress, molécules d'adhésion (CAM), récepteurs impliqués dans le chimiotactisme, enzymes intervenant dans la synthèse de polysaccharides, la protéine correspondant au gène *sthA*
- 3 : protéines de structure de la gaine, protéines de stress

- 4 : protéases spécifiques des protéines structurant la gaine, enzymes de lyse du polysaccharide, protéines liées à la mobilité des cellules.

Afin d'avoir un profil complet des protéines impliquées dans le mécanisme régissant la filamentation, il est impératif d'étudier l'expression protéique pour chacune des transitions morphologiques décrites précédemment.

L'approche protéomique reste très intéressante pour parvenir à une identification et à une analyse différentielle précise de l'expression des protéines participant au processus de filamentation et, par conséquent à la compréhension de son mécanisme moléculaire. Une séparation des protéines par électrophorèse en deux dimensions permettrait d'obtenir des profils d'expression protéiques très précis, et de visualiser plus facilement les variations entre les différents états morphologiques. L'identification des protéines est facilitée car un spot isolé correspond généralement à une seule protéine, à la différence du gel SDS-PAGE où une bande peut correspondre 20 ou 30 protéines différentes. L'analyse des données de spectrométrie de masse serait facilitée par la mise en place d'une identification des protéines par approche "*de novo*". Une fois les protéines ainsi identifiées, les séquences d'ADN correspondantes pourront être déduites et le gène recherché dans le génome de la bactérie. Cela n'a malheureusement pas pu être le cas dans le cadre de ces travaux, faute de temps et de moyens.

La méthode d'extraction des protéines pourrait également être optimisée. En effet la technique employée, décrite par Laemmli (1970), est très efficace pour l'extraction des protéines totales. Il pourrait cependant être envisagé d'avoir recours à un fractionnement sub-cellulaire, pour obtenir une préparation enrichie en enveloppes cellulaires ou en polysaccharides de gaine. Il serait ainsi possible de caractériser plus spécifiquement les protéines associées à ces compartiments cellulaires, en particuliers celles participant à la synthèse ou à la structuration de la gaine.

Bien que de nombreuses optimisations restent à réaliser, il semble que la voie de la protéomique soit la plus adaptée à la détermination du mécanisme de filamentation de *S. natans*, mais également à celle d'autres bactéries filamenteuses plus fréquemment rencontrées en boues activées.

2. Variation du signal FISH au cours du cycle cellulaire

Une connaissance précise de la population bactérienne tant d'un point de vue taxonomique que quantitatif est un élément essentiel en écologie microbienne. En effet cette discipline repose sur les interactions entre les différents microorganismes et leur environnement. Il y a encore peu de temps, l'identification était principalement basée sur des observations microscopiques ou des méthodes de culture. L'émergence de la biologie moléculaire a permis de fournir de nouveaux outils aux microbiologistes. La PCR permet une identification, en offrant la possibilité de révéler la présence ou l'absence d'un microorganisme cible dans un échantillon. La PCR en temps réel permet de rajouter un aspect quantitatif. Des techniques couplées à la réaction de polymérisation en chaîne, telles que la DGGE ou la TTGE, permettent de dresser un profil de la population, et ainsi de déterminer les espèces présentes en comparant le profil obtenu par rapport à un référentiel constitué à partir de souches pures. L'hybridation *in situ* est très certainement la technique la plus employée en écologie microbienne pour la caractérisation des microorganismes. En plus de l'identification, elle offre également la possibilité de localiser les bactéries au sein de leur environnement, mettant ainsi en évidence leurs interactions.

En ce qui concerne l'écosystème des boues activées, la population bactérienne est l'élément central puisque c'est sur elle que repose l'activité épuratrice. La caractérisation de cette population bactérienne est donc importante pour les chercheurs, mais également pour les exploitants de station. C'est en effet d'elle que va dépendre la qualité de l'eau qui sera rejetée dans le milieu naturel. Le profil de la population bactérienne dépend de nombreux facteurs tels que la nature et l'abondance des substrats disponibles, ou encore l'aération. Elle fournit donc des informations sur la composition des eaux usées et sur les éventuels dysfonctionnements de la station de traitement. Un des problèmes les plus fréquemment rencontrés dans les stations d'épuration à boues activées est le phénomène de bulking. Comme cela a précédemment été expliqué, il résulte d'une prolifération rapide et excessive de bactéries filamenteuses, aboutissant à l'impossibilité de séparer les matières en suspension de l'eau épurée.

À l'heure actuelle, très peu de moyens sont disponibles pour évaluer les populations de bactéries filamenteuses dans les boues. Seules les observations microscopiques et les mesures d'indice de boue permettent de les estimer mais avec un degré d'anticipation quasiment nul par

rapport à la survenue d'un épisode de prolifération filamenteuse. Bien que quelques études utilisant la PCR quantitative aient été réalisées (Kaetzke *et al.*, 2005; Vervaeren *et al.*, 2005), la technique d'hybridation fluorescente *in situ* reste actuellement la plus utilisée pour quantifier les bactéries filamenteuses sur des échantillons de boues activées (Gaval *et al.*, 2002; Gaval & Pernelle, 2003; Hug *et al.*, 2005). Dans ces cas, la technique est utilisée afin de quantifier les différentes populations filamenteuses dans les boues ainsi que la taille des filaments. C'est de cette manière que Gaval *et al.* (2002, 2003) ont mis en évidence une brusque augmentation du nombre de filaments de certaines espèces bactériennes après application d'un stress comme une carence en oxygène, suivie d'une diminution tout aussi rapide des effectifs après arrêt du stress (Gaval & Pernelle, 2003). Lors de l'application de stress en série, la population filamenteuse émergente est à chaque fois plus importante (cf. Figure 96). Cependant, il y a toujours une décroissance rapide de la population filamenteuse consécutive à l'arrêt du stress. Ce phénomène a été observé pour différentes espèces de bactéries filamenteuses et notamment *Thiothrix nivea*, *Thiothrix eikelboomii* (Eikelboom type 021N), *Haliscomenobacter hydrossis* et *Sphaerotilus natans*.

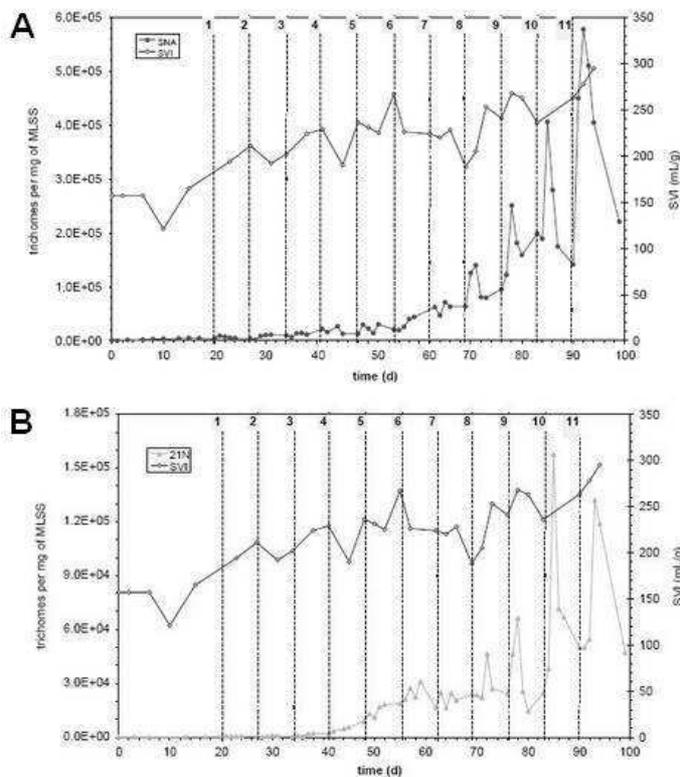


Figure 96 : Évolution du nombre de filaments (en nombre de filament par mg de matière en suspension, ou MLSS) des bactéries A) *S. natans* et B) *T. eikelboomii* (Type 021N) dans un pilote, après application d'une série de onze stress correspondants à un déficit en oxygène. La quantité de trichomes est estimée par FISH, en utilisant la sonde SNA pour *S. natans*, et 21N pour *T. eikelboomii*. Parallèlement, l'indice de boue (SVI) est mesuré. Les lignes en pointillés correspondent à l'application d'un stress (extrait de Gaval et Pernelle, 2003).

L'élément qui ressort de cette étude est que la disparition des filaments faisant suite à la suppression du stress est tout aussi rapide que la prolifération induite par son application. De plus on voit nettement que l'évolution de l'indice de boue ne reflète pas réellement l'abondance de filaments. En effet, lorsque l'indice commence juste à augmenter, la quantité de filaments est déjà très importante. De même, la disparition brutale des filaments n'entraîne pas immédiatement une diminution de l'indice de boue.

La diminution rapide des effectifs filamenteux est à l'origine de l'hypothèse selon laquelle, lors d'un retour à une situation favorable, les trichomes seraient capables de se déstructurer, de se "défilamentar", aboutissant ainsi à une population dispersée.

Dans le cadre d'une autre étude, une comparaison de la quantification de bactéries nitrosantes par les techniques de PCR quantitative en temps réel et d'hybridation *in situ* (Olivier, 2005a) en eau de Seine a été réalisée. Les deux techniques donnent des résultats significativement différents (cf. Figure 97).

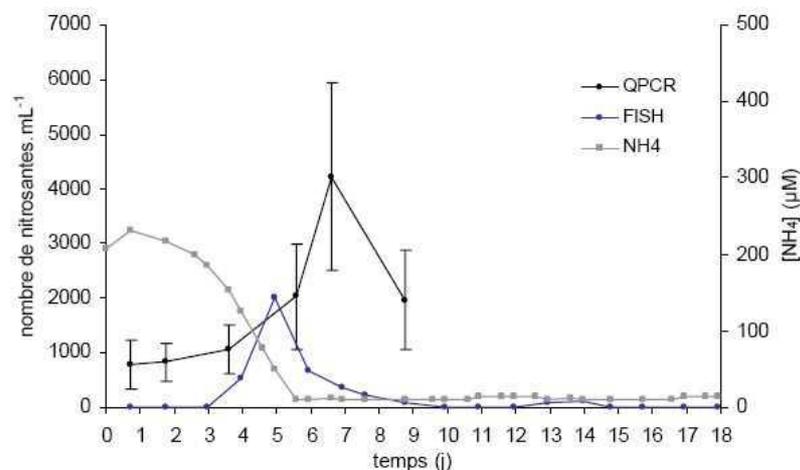


Figure 97 : Comparaison des dynamiques de concentrations des bactéries nitrosantes estimées via la technique FISH (●), en utilisant la sonde NEU, et la PCR quantitative en temps réel (●) au cours de la nitrosation dans un réacteur (Olivier, 2005a).

Ces résultats mettent clairement en évidence que la technique FISH sous-estime très fortement les effectifs par rapport à la QPCR. On note de plus que la quantification basée sur l'hybridation *in situ* fait apparaître une chute des effectifs des bactéries nitrosantes alors que, celle obtenue par QPCR montre que la population bactérienne continue d'augmenter. La population estimée par FISH semble s'effondrer alors que les bactéries entrent en phase

exponentielle. La quantification par FISH semble donc affectée par un changement de l'état physiologique des bactéries.

Lors de nos observations précédentes sur les transitions morphologiques de *S. natans*, nous n'avons jamais observé la disparition totale des filaments lors d'un retour à des conditions environnementales plus favorables pour les microorganismes. Ils ont effectivement tendance à se développer sous leur forme monocellulaire, mais la forme filamenteuse reste présente. Ces résultats associés à ceux des précédentes études, nous permettent d'avancer l'hypothèse que la disparition observée des filaments des boues lors de la suppression d'un stress (Gaval *et al.*, 2000a; Gaval & Pernelle, 2003) pourraient être dues à la technique FISH qui sous-estimerait de façon importante la quantité de filaments après une phase initiale de croissance. Il semble en effet qu'une variation importante de l'intensité de fluorescence lors du cycle de croissance des cellules puisse entraîner un biais de la quantification des effectifs filamenteux.

2.1 Évolution de l'intensité du signal FISH lors du cycle de croissance

2.1.1 Sphaerotilus natans

Nous avons dans un premier temps réalisé des cultures pures de la souche *Sphaerotilus natans* 29330 en réacteur. Nous avons choisi cette souche car c'est la seule de l'espèce *S. natans* qui soit capable de croître principalement sous forme monocellulaire dans ces conditions, permettant ainsi une analyse par cytométrie en flux. L'inoculum utilisé pour ensemercer les réacteurs est préparé à partir d'une culture de cellules dispersées et âgée de 16 heures. Les conditions de culture sont indiquées dans le chapitre Matériels et Méthodes. Lors de ces cultures nous avons réalisé différents prélèvements afin d'établir la courbe de croissance des microorganismes (cf. Figure 98). La courbe a été déterminée en utilisant deux techniques distinctes :

- le marquage des cellules au cFDA et le dénombrement en cytométrie en flux
- la mesure de la turbidité à 600 nm.

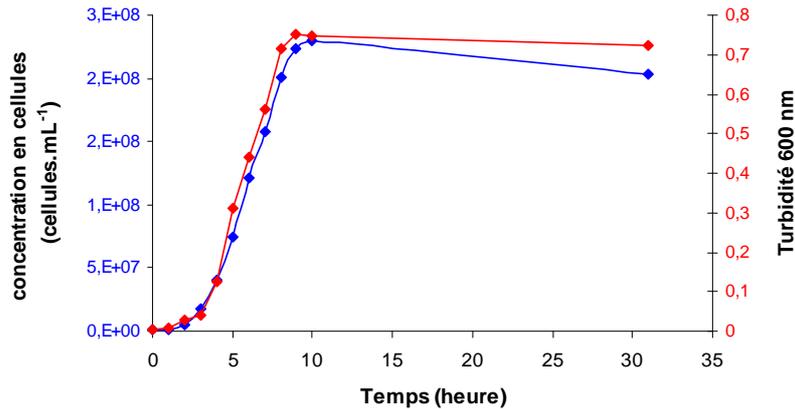


Figure 98 : Courbes de croissance de la souche *S. natans* 29330 lors d'une culture en réacteur déterminées par cytométrie en flux (♦) et mesure de la turbidité à 600 nm (♦).

Les deux techniques donnent des courbes de croissance très similaires. On note cependant que par cytométrie en flux, la population estimée après 31 heures de culture, c'est-à-dire 12 heures après l'entrée en phase stationnaire, diminue alors que celle estimée par mesure de la turbidité à 600 nm reste stable. Ceci peut s'expliquer par le fait que seules les cellules vivantes possèdent l'activité enzymatique estérase nécessaire au clivage du cFDA en cF, qui émet la fluorescence. Après la phase stationnaire, la culture bactérienne entre dans une phase de déclin, qui correspond à une augmentation de la mortalité cellulaire. Le nombre de cellules vivantes diminue, ce que reflète le dénombrement par cytométrie en flux. La mesure de densité optique quant à elle ne traduit pas, au moins dans un premier temps, cette mortalité. Les cellules mortes et les débris cellulaires, vont contribuer à maintenir une valeur de turbidité élevée. Nous avons donc choisi, pour la suite des travaux, d'établir la courbe de croissance en utilisant la technique de dénombrement par cytométrie en flux.

Il faut également noter que seule une très brève phase de latence est observée. Ceci peut s'expliquer par le fort taux d'ensemencement du réacteur (près de 1.10^6 cellule.mL⁻¹), et par le fait que les bactéries étaient en pleine phase exponentielle de croissance au moment de leur injection dans le réacteur

Parallèlement à la courbe de croissance, nous avons mesuré l'intensité du signal FISH par cellule (cf. Figure 99). Un marquage en milieu liquide a donc été réalisé pour chacun des échantillons selon le protocole décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. L'hybridation a été effectuée à l'aide de la sonde EUB 338 et l'intensité de fluorescence par cellule a été déterminée par cytométrie en flux.

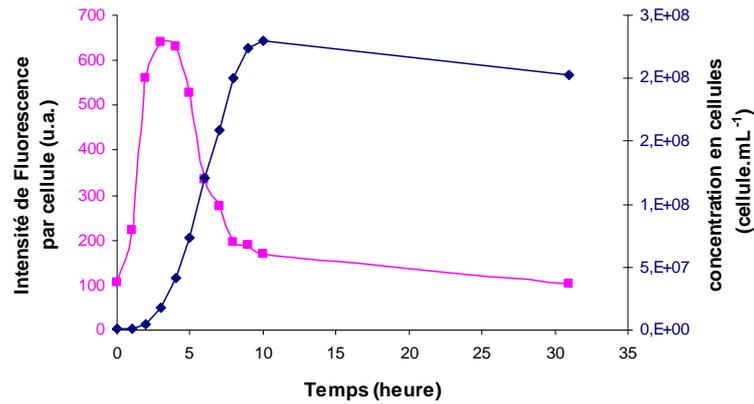


Figure 99 : Courbe de croissance de la souche *S. natans* 29330 (■) et évolution de l'intensité de fluorescence par cellule du marquage FISH avec la sonde EUB338 (◆), exprimées en unités arbitraires (u.a.), et déterminée par cytométrie en flux.

On peut constater une importante variation de l'intensité de fluorescence au cours du cycle de croissance de *S. natans* 29330. Elle augmente fortement lors des premières heures, avant d'atteindre sa valeur maximale, 6 fois supérieure à sa valeur initiale, après 4 heures de culture. Au-delà de la 5^{ème} heure, la fluorescence diminue rapidement alors que la croissance est toujours dans sa phase exponentielle. Le signal FISH par cellule atteint une valeur proche de la valeur initiale après seulement 10 heures de culture alors que la croissance entre dans sa phase stationnaire. Après 24 heures, l'intensité est à son niveau minimum, correspondant à la fluorescence initiale, alors que la culture est engagée dans la phase de déclin.

À partir des dénombrements obtenus par cytométrie en flux, le taux de croissance (μ) au moment de chacun des prélèvements a été calculé. Cette variable caractérise l'accroissement de la population par unité de temps, ici par heure. La formule utilisée est la suivante :

$$\text{Ln}\left(\frac{X_n}{X_{n-1}}\right) = \mu \cdot (t_n - t_{n-1})$$

Ce qui implique que :

$$\mu = \frac{\text{Ln } X_n - \text{Ln } X_{n-1}}{t_n - t_{n-1}}$$

X correspond à la quantité de biomasse. Le paramètre utilisé pour estimer la biomasse est le nombre de cellules déterminé en cytométrie en flux après marquage au cFDA, donc la quantité de cellules viables dans 1 mL de culture.

Le taux de croissance permet d'estimer l'état physiologique de la culture : plus sa valeur est élevée, plus l'activité cellulaire est importante.

L'évolution de l'intensité de fluorescence du marquage FISH et celle du taux de croissance au cours de la culture en réacteur sont ensuite comparées (cf. Figure 100).

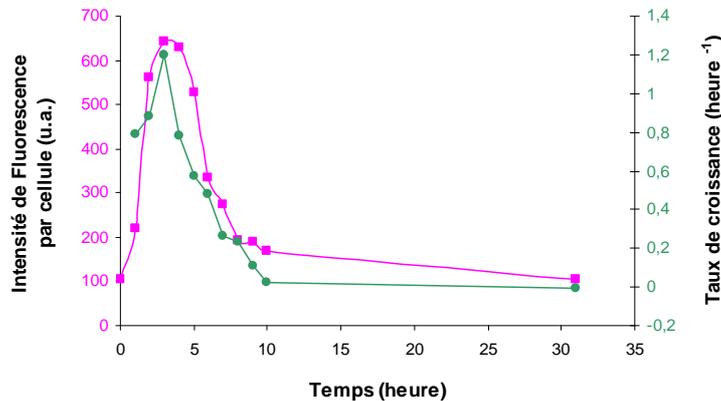


Figure 100 : Évolution de l'intensité de fluorescence par cellule du marquage FISH avec la sonde EUB338 (■) et du taux de croissance (●) de la souche *S. natans* 29330 lors de la culture en réacteur.

La variation de l'intensité du signal est corrélée avec la variation du taux de croissance des bactéries. Ceci conforte l'idée que le niveau de fluorescence dépend directement de l'état physiologique de la cellule. Il faut cependant noter qu'après avoir atteint sa valeur maximale, l'intensité de fluorescence diminue légèrement plus lentement que le taux de croissance.

Afin de déterminer si ce phénomène est spécifique à *S. natans*, les mêmes expérimentations ont été menées sur deux autres types de microorganismes éloignés :

- *Lactobacillus delbruekii* subsp. *Bulgaricus* CNRZ 208T, une bactérie Gram-positve entrant dans le processus de fabrication des yaourts.
- *Saccharomyces cerevisiae* L2056, un microorganisme eucaryote de type levure.

Des cultures de ces deux microorganismes sont réalisées en réacteurs dans les conditions décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes. La détermination de la courbe de croissance n'est cette fois réalisée qu'à partir des données obtenues par dénombrement en cytométrie en flux.

2.1.2 *Lactobacillus delbruekii*

Lors du suivi de l'intensité, le marquage FISH a été réalisé en utilisant la sonde EUB338, comme pour *S. natans* 29330 (cf. Figure 101).

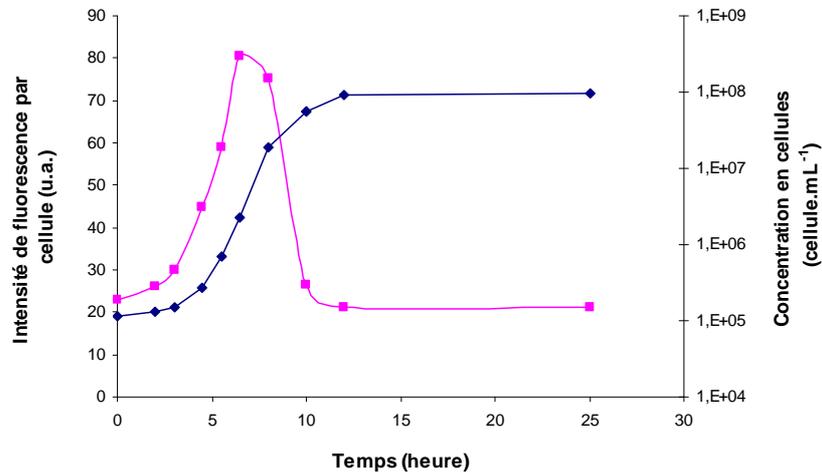


Figure 101 : Courbe de croissance de la souche *L. delbruekii* (♦), et évolution de l'intensité du marquage FISH avec la sonde EUB338 (■) au cours de la culture en réacteur.

De la même façon que pour *S. natans*, l'intensité de fluorescence varie de façon importante au cours du cycle de croissance de la bactérie. Là encore, le signal augmente très fortement dans les derniers temps de la phase de latence, avant d'atteindre sa valeur maximale au début de la phase exponentielle de croissance. À ce moment là, l'intensité de fluorescence est 3,5 fois plus importante que lors des deux premières heures de culture. À partir de la 6^{ème} heure, alors que les effectifs cellulaires augmentent de façon importante, l'intensité la fluorescence chute pour atteindre, après seulement 12 heures, une valeur équivalente à celle observée au début de la phase de latence.

Les évolutions du taux de croissance et de l'intensité de fluorescence de *L. delbruekii* sont comparées (cf. Figure 102).

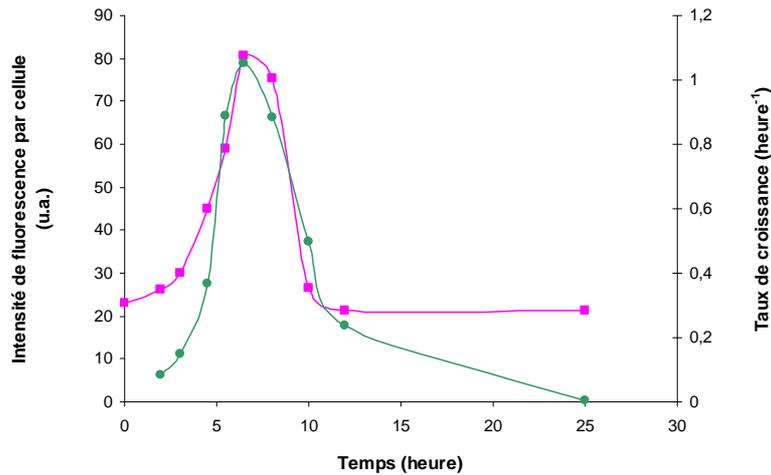


Figure 102 : Évolution de l'intensité de fluorescence par cellule lors du marquage FISH (■) et du taux de croissance (●) lors de la culture de *L. delbruekii* en réacteur.

Comme pour *S. natans*, l'intensité de fluorescence suit la même évolution que le taux de croissance qui atteint sa valeur maximale après 6,5 heures de culture, au moment où l'intensité de fluorescence est la plus élevée. Là encore, le niveau de fluorescence des cellules décline immédiatement, jusqu'à atteindre sa valeur minimale après 12 heures de culture. Le taux de croissance chute également à partir de la 8^{ème} heure de culture jusqu'à devenir nul à 25 heures.

Des mesures de pH réalisées tout au long de la culture, permettent de déterminer l'évolution de la vitesse d'acidification du milieu (cf. Figure 103).

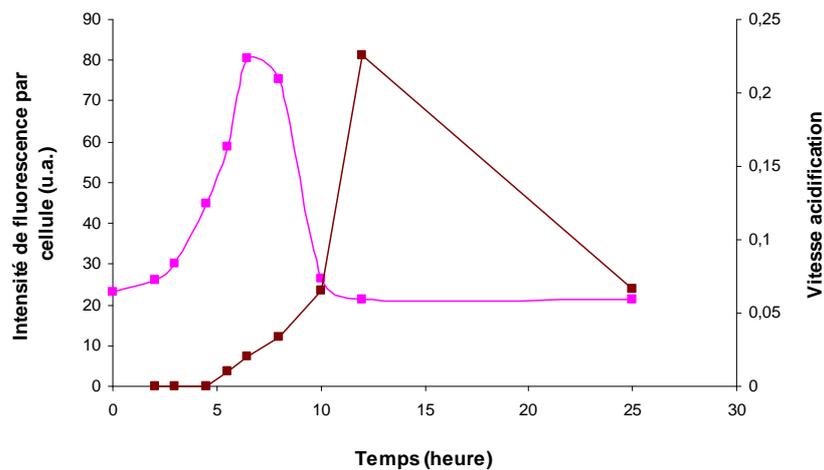


Figure 103 : Évolution de l'intensité de fluorescence par cellule lors du marquage FISH (■) et de la vitesse d'acidification du milieu (■) lors de la culture de *L. delbruekii* en réacteur.

On constate que la vitesse d'acidification augmente rapidement alors que l'intensité du marquage FISH diminue. La vitesse maximale est atteinte alors que le niveau de fluorescence est lui redescendu à son niveau minimal. En effet, la vitesse d'acidification du milieu suit la courbe de croissance, et s'effondre lorsque la culture entre en phase stationnaire, la diminution de l'activité physiologique des cellules, liée à l'épuisement du substrat étant à l'origine de cette chute. Parallèlement à cela, l'acidification du milieu va avoir un effet inhibiteur sur la croissance des microorganismes.

La variation d'intensité du signal FISH au cours du cycle de croissance et de l'activité physiologique des cellules semble donc être un phénomène commun à des bactéries très éloignées d'un point de vue phylogénétique. L'étape suivante consiste à déterminer si ce phénomène peut également être observé chez un microorganisme eucaryote, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Comme pour les deux souches bactériennes, *Saccharomyces cerevisiae* L2056 a été cultivée en réacteur dans les conditions de culture décrites dans le chapitre Matériels et Méthodes. Le suivi a été réalisé sur 70 heures, avec des prélèvements toutes les 2 heures. Un dénombrement par cytométrie en flux des cellules viables, une mesure de l'intensité du marquage FISH avec la sonde PF2 (cf. Figure 104), ainsi qu'une mesure de la production d'éthanol ont été réalisés sur chacun des échantillons.

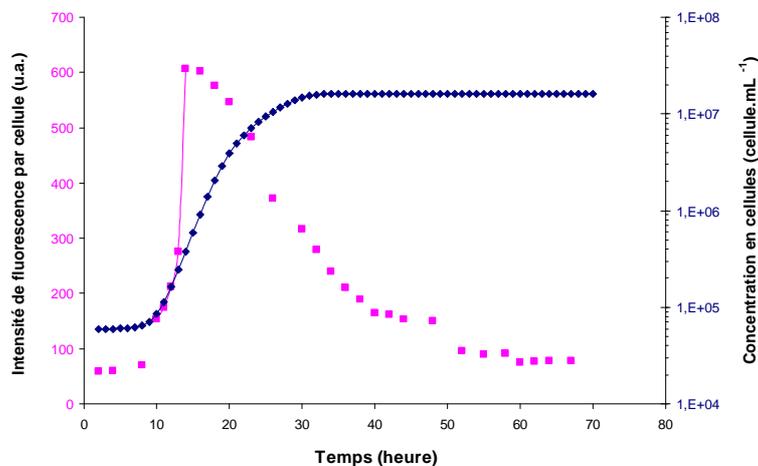


Figure 104 : Courbe de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* L2056 lors de sa culture en réacteur (♦) et évolution de l'intensité de fluorescence par cellule lors du marquage FISH avec la sonde PF2 (■).

On s'aperçoit de nouveau, qu'après être restée stable durant les 8 premières heures de culture, l'intensité de fluorescence augmente de façon importante en fin de phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance. Après 14 heures de culture, la fluorescence par cellule est maximale et atteint un niveau près de 10 fois supérieur à celui d'origine. Le signal FISH chute ensuite régulièrement et atteint, à la 40^{ème} heure, une valeur 4 fois inférieure à la valeur maximale. À partir de la 50^{ème} heure de culture le niveau de fluorescence atteint son niveau minimal.

L'intensité de fluorescence maximale est atteinte durant la première moitié de la phase exponentielle. En début de phase stationnaire, même si le niveau du signal est faible, contrairement à ce qui a été observé pour les deux souches bactériennes, il n'a pas encore atteint sa valeur minimale.

Le taux de croissance est calculé à partir du dénombrement par cytométrie en flux. La courbe d'évolution de ce paramètre est superposée à celle de l'intensité du marquage FISH (cf. figure 105).

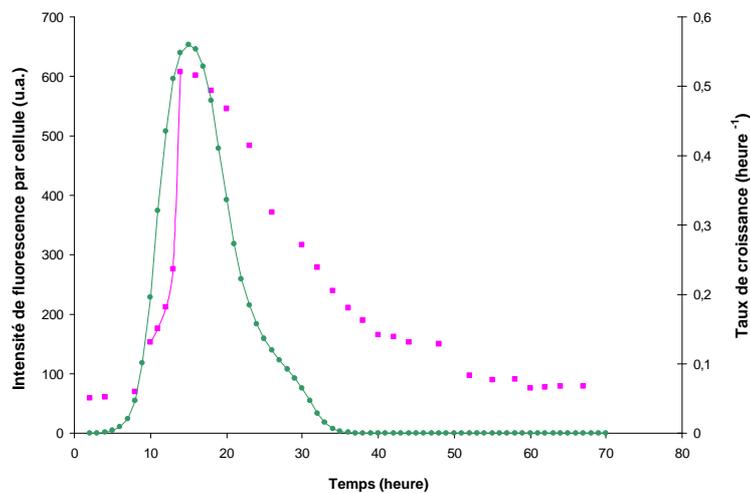


Figure 105 : Évolution de l'intensité de fluorescence par cellule lors du signal FISH obtenu lors du marquage avec la sonde PF2 (■) et du taux de croissance (●) lors de la culture de *S. cerevisiae* en réacteur.

De même que ce qui a été observé pour les bactéries, l'augmentation de l'intensité du signal FISH est concomitante à celle de la valeur du taux de croissance. De plus, le taux de croissance maximal est atteint après 15 heures de culture, soit au moment où la fluorescence par cellule est la plus importante. Il faut cependant noter qu'à la 37^{ème} heure du suivi, alors que

l'intensité du signal est encore 2 fois supérieure à son niveau le plus faible, le taux de croissance est lui déjà nul.

La production d'éthanol a également été mesurée lors du suivi (cf. Figure 106).

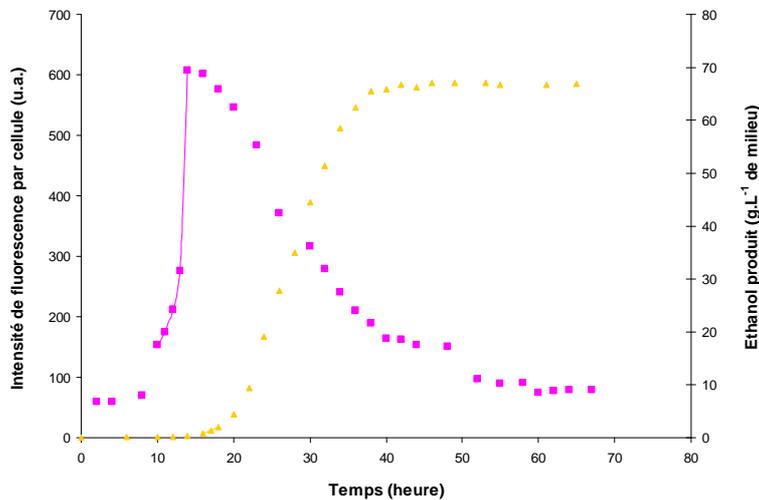


Figure 106 : Évolution de l'intensité de fluorescence par cellule résultant du marquage FISH par la sonde PF2 (■) et de la quantité d'éthanol produit (▲) lors de la croissance de *S. cerevisiae* en réacteur.

La quantité d'éthanol produite et rejetée dans le milieu commence à augmenter de façon exponentielle à partir de 20 heures de culture, soit 6 heures après que la fluorescence ait atteint son intensité maximale. La quantité d'éthanol présente dans le milieu est directement liée à la courbe de croissance des microorganismes.

Une culture de *S. cerevisiae* en conditions stressantes est réalisée afin d'estimer la variation de l'intensité de fluorescence du signal FISH dans des conditions où l'activité cellulaire n'était pas optimale. Le suivi est réalisé dans un réacteur contenant 1,5 L de milieu de Sabouraud à 150 g.L⁻¹ de glucose, mais cette fois la température du réacteur est fixée à 35°C et le pH à 3,2. Le même suivi est effectué dans ces conditions particulières (cf. Figure 107).

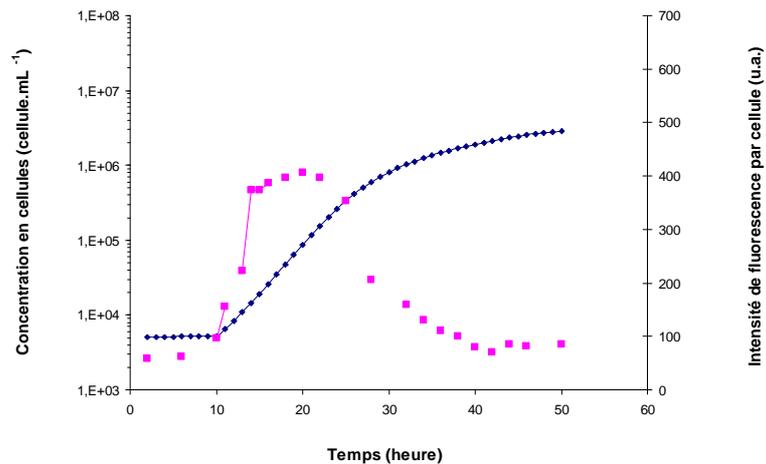


Figure 107 : Courbe de croissance de *S. cerevisiae* lors de la culture en réacteur en conditions défavorables, soit à 35°C et pH 3,2, (♦), et évolution de l'intensité du signal FISH par cellule (■).

La courbe de croissance reflète clairement que les conditions sont devenues moins favorables pour le microorganisme. La phase dite exponentielle démarre après 10 heures de culture, soit seulement 2 heures après celle observée dans les conditions optimales. Cependant, elle est beaucoup plus lente puisque la phase stationnaire n'est atteinte qu'après environ 60 heures. De plus la concentration maximale en microorganismes dans le milieu est beaucoup plus faible et près de 6 fois inférieure à celle obtenue lors de la culture précédente.

En ce qui concerne l'intensité du marquage FISH, la valeur maximale, qui dans ce cas n'est atteinte qu'à la 20^{ème} heure, ne représente que 67% de la valeur maximale obtenue dans les conditions précédentes. Le signal fluorescent par cellule est différent. On observe une augmentation brusque de son intensité à partir de la 10^{ème} heure de culture, puis entre 14 et 25 heures il atteint un plateau d'une valeur moyenne très proche de la maximale observée à la 20^{ème} heure de culture. Le signal diminue ensuite brutalement jusqu'à la 28^{ème} heure, puis plus lentement jusqu'à sa valeur minimale, 40 heures après le début de la fermentation.

Lorsque l'on compare l'intensité du marquage FISH au cours de la croissance et l'évolution du taux de croissance calculé à l'aide du dénombrement en cytométrie en flux, là encore on s'aperçoit que les deux critères co-évoluent de la même façon (cf. Figure 108). Le taux de croissance augmente très brutalement entre la 10^{ème} et la 11^{ème} heure, puis plus lentement avant d'atteindre sa valeur maximale après 17 à 18 heures. Il diminue ensuite régulièrement jusqu'à devenir quasiment nul après 50 heures de culture. Là encore la courbe représentant

l'évolution du taux de croissance est plus aplatie et étalée que celle obtenue lors de la culture dans des conditions optimales.

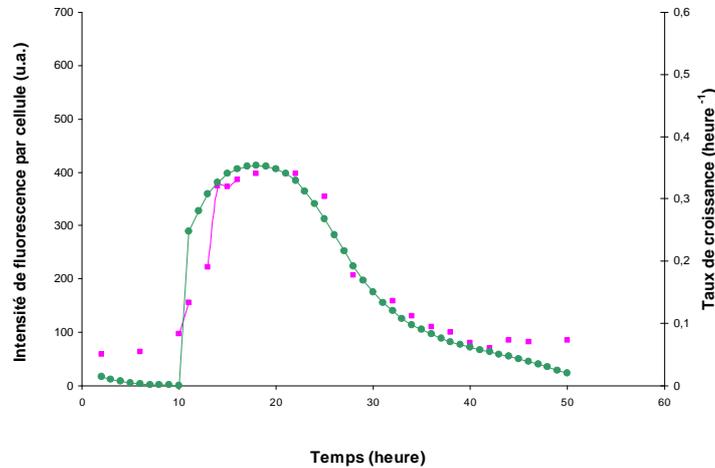


Figure 108 : Évolution de l'intensité de fluorescence par cellule lors du marquage FISH avec la sonde PF2 (■) et du taux de croissance (●) lors de la croissance de *S. cerevisiae* en conditions défavorables.

Alors que la croissance s'étale sur une période plus longue, elle reste en termes d'effectifs, moins importante que dans des conditions optimales. Le niveau de fluorescence reste lui aussi haut durant une plus longue durée tout en ayant une intensité maximale moins élevée que dans le cas précédent. On voit donc que dans ces conditions de stress, l'intensité du signal FISH est une nouvelle fois en corrélation directe avec le taux de croissance des microorganismes.

Conclusion :

Ces suivis de croissance de différents microorganismes mettent en évidence que l'intensité de fluorescence par cellule lors du marquage FISH varie de façon très importante en fonction de la phase du cycle de croissance de la cellule. Le niveau d'activité cellulaire variant au cours de la croissance, le niveau de fluorescence par cellule varie donc en fonction de l'état physiologique du microorganisme. Ces expériences montrent que ce phénomène est retrouvé chez des microorganismes unicellulaires aussi éloignés que des eucaryotes et des procaryotes. Selon les espèces étudiées, l'intensité du signal peut varier d'un facteur six en fonction de la phase du cycle de croissance. Ainsi, si la cellule se trouve en début de phase stationnaire ou en fin de phase exponentielle, l'intensité du signal fluorescent sera à son niveau minimal. Il faut donc considérer avec une extrême prudence les résultats de quantifications de microorganismes basés sur la technique d'hybridation *in situ*, car dans des

échantillons complexes, des microorganismes présentant un niveau de fluorescence très faible ou proche du bruit de fond peuvent ne pas être détectés par l'observateur ou bien par un logiciel de quantification de type DAIME (Daims *et al.*, 2006). L'utilisateur doit fixer un seuil de fluorescence limite en dessous duquel les éléments ne sont pas comptabilisés. De plus, l'hybridation n'est pas aussi efficace pour tous les microorganismes et en particulier pour les bactéries filamenteuses (Müller *et al.*, 2007), notamment du fait de la présence d'une gaine chez certaines espèces, comme *S. natans*. Certaines sont même indétectables par la technique FISH (Wallner *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2007). Dans les boues activées, ces microorganismes sont le plus souvent très peu actifs d'un point de vue physiologique. Les eaux de rivière ou de mer, beaucoup moins riche en substrat, sont encore moins favorables à la croissance des microorganismes.

Ces éléments cumulés peuvent rendre leur détection délicate et introduire des biais importants lors de leur quantification par hybridation *in situ* en sous-estimant les populations présentes.

La variation de l'intensité de fluorescence ne suit pas du tout la courbe de croissance puisqu'elle chute brutalement jusqu'à atteindre une valeur très faible durant la phase exponentielle de croissance. Des microorganismes encore très actifs peuvent ainsi ne pas être détectés, entraînant une sous-estimation importante la population cible. L'efficacité et l'exactitude de la quantification basée sur la technique FISH dépendent du stade de croissance de la cellule au moment de l'observation. Dans un milieu aussi complexe et présentant une diversité bactérienne aussi importante que les boues activées, les diverses populations sont dans des états différents et il est très difficile, voire impossible, de déterminer le niveau d'activité de la population ciblée par hybridation *in situ*.

Ces éléments permettent donc de dire que l'utilisation de la technique FISH pour la quantification des microorganismes doit être considérée avec précaution, en particulier dans le cas de matrices complexes ou de bactéries ayant une activité physiologique faible.

Une précédente étude, basée sur la quantification des filaments par FISH, décrivaient une forte diminution du nombre de filaments, dans des boues activées, suite à l'arrêt d'une situation de stress (Gaval, 2001a). L'hypothèse d'un phénomène de défilamentation avait alors été émise. Lors de ces expérimentations, la disparition massive des filaments suite à leur transfert dans un milieu induisant la croissance sous forme monocellulaire n'a jamais été observée, ce qui est donc en désaccord avec l'hypothèse émise précédemment. Le fait que la

quantification des filaments ait été réalisée par la technique FISH amène donc à remettre en cause l'existence de ce phénomène de défilamentation. En effet, les résultats de cette étude montrent que la chute du nombre de filaments pourrait en réalité être due à une diminution importante de la fluorescence et donc à une sous-estimation des effectifs réellement présents.

2.2 Étude de la variation de la quantité d'ARN ribosomiques intracellulaires au cours de la croissance des microorganismes.

La variation de l'intensité du signal FISH des cellules en fonction de la phase du cycle de croissance étant établie, nous avons cherché à déterminer quelle en était la cause. Deux hypothèses pourraient expliquer les fortes variations de l'intensité du signal FISH pendant le cycle de croissance : une variation de la quantité d'ARNr dans la cellule, ou une variation de l'accessibilité de la sonde à l'ARNr. La cible des sondes utilisées pour le marquage FISH est l'ARNr de la petite sous-unité du ribosome, appelé ARNr SSU (Small SubUnit). Il s'agit de l'ARNr 16S des bactéries et de l'ARNr 18S de *S. cerevisiae*. La variation du niveau général de fluorescence devrait donc être directement liée à la variation du niveau de celui-ci, si la première hypothèse est valide.

Différents auteurs ont déjà décrit une variation de la concentration intracellulaire en ARNr durant le cycle de croissance des levures (Waldron & Lacroute, 1975; Ju & Warner, 1994; Warner, 1999; Amann & Ludwig, 2000) et des bactéries (Kerkhof & Ward, 1993; Binder & Liu, 1998; Worden & Binder, 2003) affirmant qu'elle était directement liée à l'activité physiologique de la cellule. Cependant dans ces études, la concentration en ARNr cellulaire a été estimée par des techniques de mesure indirectes, en particulier l'hybridation *in situ*. Si la chute de l'intensité de fluorescence était due à une altération de l'accessibilité des séquences cibles d'ARNr aux sondes, le FISH ne permettrait pas de le mettre en évidence et l'assimilerait à une diminution de la quantité d'ARN.

Un suivi de la concentration en ARNr par cellule a été réalisé par RT-QPCR au cours de la croissance des 3 microorganismes, *S. natans*, *L. delburekii* et *S. cerevisiae* pour lesquels une forte variation du marquage FISH a été identifiée au cours du cycle de croissance.

Les ARN totaux sont extraits à partir de 25 mL de culture, en suivant le protocole décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Une réaction de transcription inverse est réalisée sur une quantité d'ARN correspondant à un même nombre de cellules, pour chacun des échantillons. Cette quantité d'ARN est déterminée grâce au dénombrement des cellules par cytométrie en flux et au dosage de l'ARN total extrait par le système Qubit (Invitrogen). La réaction de PCR est ensuite réalisée en utilisant pour *S. natans* et *L. delbruekii* le couple d'amorces universelles 357F/518R ciblant l'ARNr 16S et pour *S. cerevisiae*, le couple d'amorces YEASTF/YEASTR ciblant l'ARNr 26S ou LSU (Large SubUnit).

2.2.1 *Sphaerotilus natans* 29330

Un suivi de la concentration intracellulaire en ARNr a été réalisé par RT-QPCR à partir des échantillons prélevés durant la croissance de *S. natans* (cf. Figure 109). La quantité d'ARN est exprimée de façon relative par rapport à la plus faible valeur.

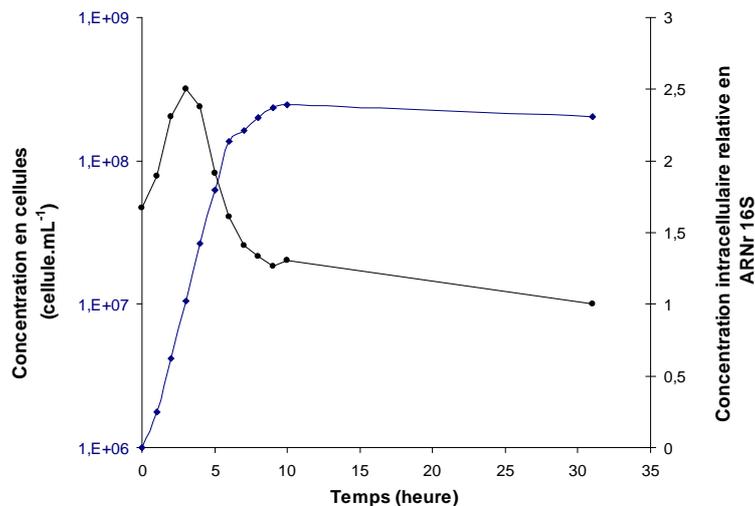


Figure 109 : Courbe de croissance de la souche *S. natans* 29330 (♦) et évolution de la concentration intracellulaire en ARNr 16S déterminée par RT-QPCR (●) lors de la culture en réacteur.

La concentration intracellulaire en ARNr 16S varie de façon très importante au cours du cycle de croissance : entre l'ensemencement du réacteur et la 3^{ème} heure de culture, la concentration en ARNr 16S augmente d'un facteur proche de deux. Elle diminue ensuite très rapidement pour atteindre après 6 heures de culture une valeur inférieure à la concentration de départ. En fin d'expérimentation, la quantité d'ARNr 16S par cellule est 2,5 fois inférieure à la valeur maximale.

Cette concentration maximale en ARNr 16S est atteinte après 3 heures de culture, ce qui correspond au moment où l'intensité du signal FISH par cellule et le taux de croissance sont les plus importants (cf. Figure 110).

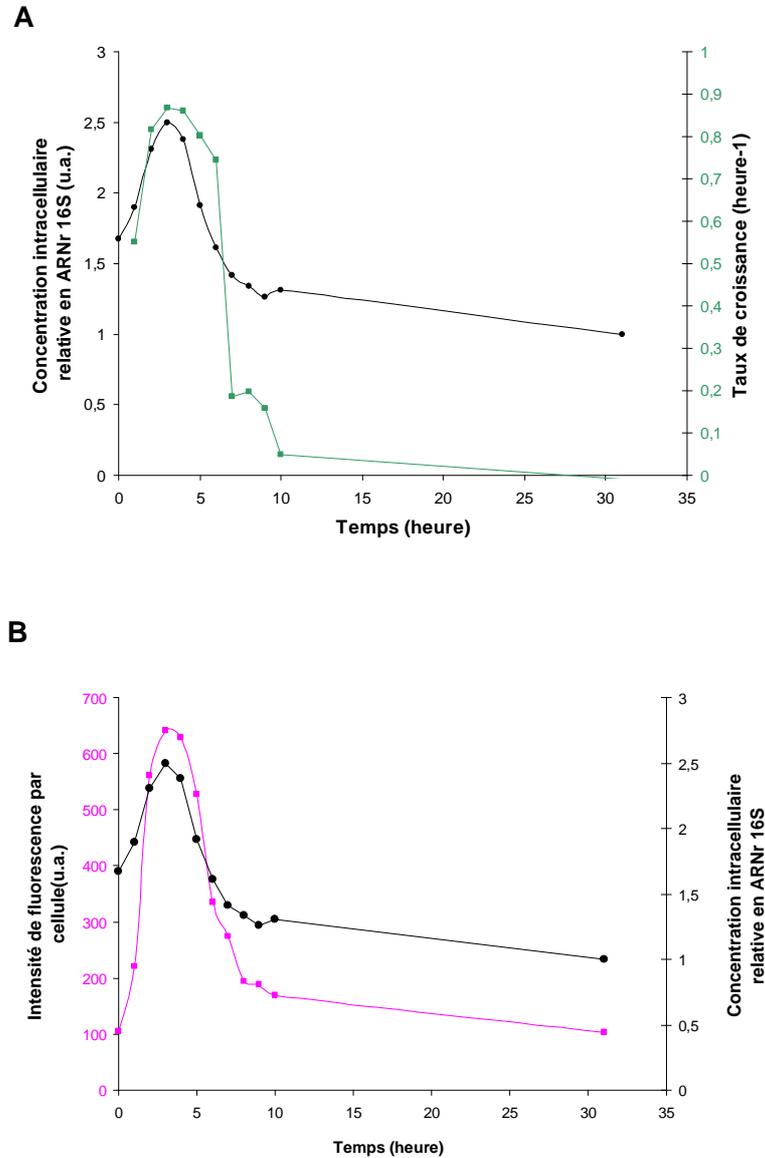


Figure 110 : Évolution de la concentration intracellulaire en ARNr 16S (●), du taux de croissance (◐) (A) et de l'intensité du marquage FISH (■) lors de la culture de *S. natans* 29330 en réacteur (B).

L'augmentation et la diminution de l'intensité du marquage FISH au cours du cycle de croissance de *Sphaerotilus natans* reflète les variations de concentration en ARNr des cellules. Il semble cependant que l'amplitude de variation du signal fluorescent soit plus importante que celle de la concentration en ARNr.

2.2.2 *Lactobacillus delbruekii*.

Cette fois le suivi de la concentration en ARNr 16S au cours du cycle de croissance a uniquement été réalisé sur les 10 premières heures de la culture (cf. Figure 111), cette période est suffisante pour observer l'augmentation puis la décroissance de l'intensité du signal FISH.

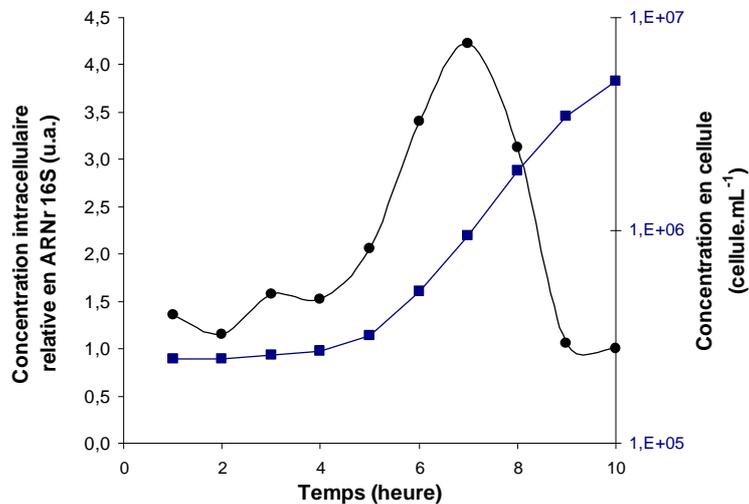


Figure 111 : Courbe de croissance de la souche *L. delbruekii* (■) et évolution de la concentration intracellulaire en ARNr 16S déterminée par RT-QPCR (●).

Comme cela avait été mis en évidence pour *S. natans*, on observe une augmentation de la concentration en ARNr 16S à partir de la fin de la phase de latence, qui s'accroît fortement au début de la phase exponentielle de croissance. La teneur maximale en ARNr est obtenue 7 heures après l'introduction de l'inoculum dans le réacteur, puis elle diminue rapidement pour atteindre une valeur inférieure à la valeur de départ. Entre la 7^{ème} et la 9^{ème} heure de culture, la concentration intracellulaire en ARNr 16S a été divisée par quatre.

Là encore, on s'aperçoit que les variations de l'intensité du marquage obtenue par hybridation *in situ* de la sonde EUB338 suivent les variations de la teneur en ARNr 16S des microorganismes et du taux de croissance, comme cela avait déjà été observé pour *S. natans* (cf. Figure 112 A et B).

Les amplitudes de variation du taux d'ARNr intracellulaire et de l'intensité du signal par cellule sont très proches chez *L. delbruekii*. Ainsi, pour l'intensité du signal fluorescent comme pour la concentration en ARNr 16S, la valeur minimale est quatre fois inférieure à la valeur maximale, révélant un lien direct entre la réponse du signal FISH et la teneur en ARNr.

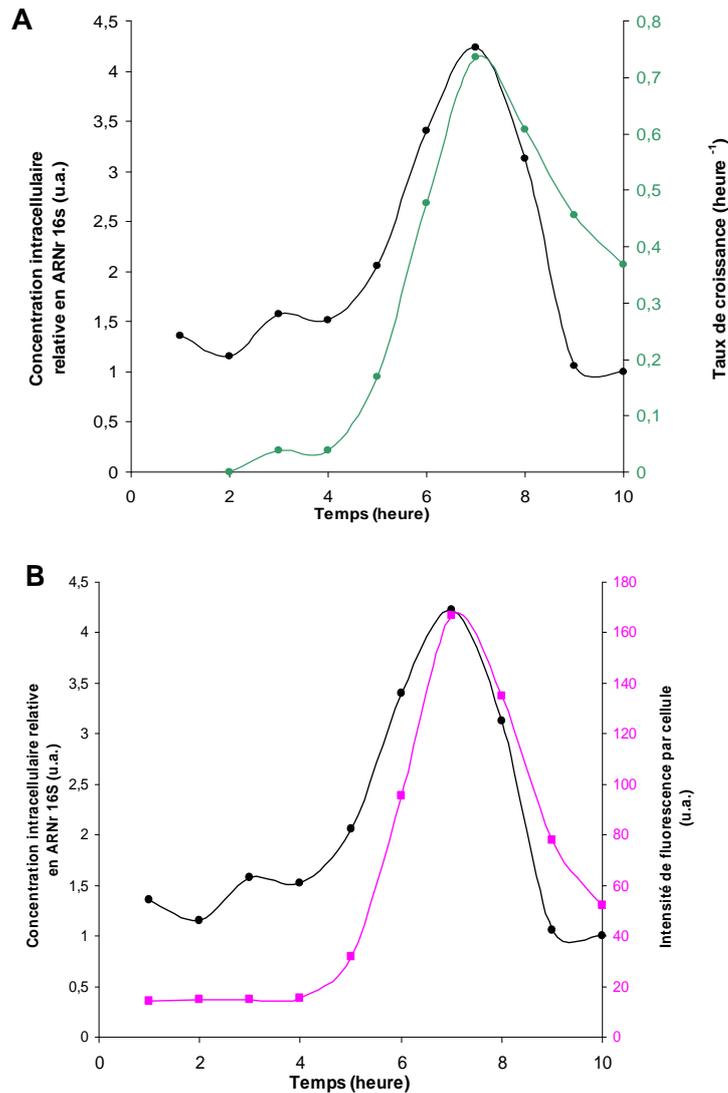


Figure 112 : Évolution de la concentration intracellulaire en ARNr 16S (●), du taux de croissance (●) (A) et de l'intensité du marquage FISH (■) (B) lors de la culture de *L. delbruekii* en réacteur.

Cette différence de résultats avec *S. natans* 29330 pourrait s'expliquer par le fait que *L. delbruekii* est une bactérie Gram-positif. En effet, les bactéries Gram-négatives, et

notamment les filaments (Müller *et al.*, 2007), présentent une efficacité d'hybridation généralement supérieure à celle obtenue pour les bactéries filamenteuses Gram-positives. Pour ces dernières, des prétraitements sont souvent nécessaires pour assurer un marquage satisfaisant, mais cela n'a pas été le cas pour *L. delbruekii*.

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Nous avons également réalisé un suivi de la croissance de *S. cerevisiae* afin de déterminer l'évolution de la concentration en ARNr 26S (cf. Figure 113). Les prélèvements ont été réalisés entre la 12^{ème} et la 21^{ème} heure suivant l'inoculation du réacteur, correspondant à la phase exponentielle de croissance.

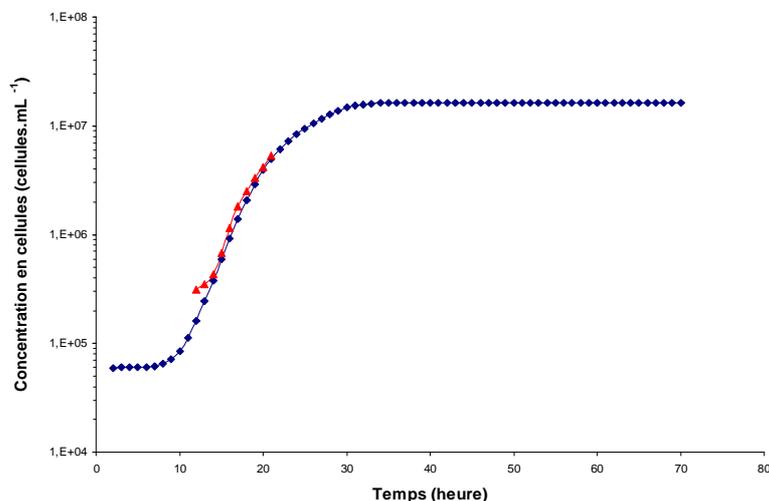


Figure 113 : Courbes de croissance de *S. cerevisiae* réalisées lors de la première expérience (◆), et lors de la seconde expérience (▲) au cours de laquelle les concentrations en ARNr 26S intracellulaire ont été mesurées par RT-QPCR.

Durant cette période, le niveau de fluorescence atteint sa valeur maximale après 16 heures de culture, avant de diminuer très rapidement. Ainsi après 21 heures, le signal a été divisé par trois par rapport à son niveau maximal (cf. Figure 114 A).

Il apparaît une nouvelle fois que l'intensité de fluorescence résultant du marquage des cellules par la sonde PF2 suit directement les variations de concentration de l'ARNr 26S (cf. Figure 114 B). Les deux paramètres atteignent leurs valeurs maximales vers 16 heures de culture en réacteur et varie de la même façon. Ainsi les valeurs maximales de l'intensité de fluorescence et de la concentration intracellulaire en ARNr 26S sont environ trois fois supérieures aux

valeurs minimales, plus précisément 2,7 fois supérieure pour la concentration en ARNr, et 3 fois pour le niveau de fluorescence

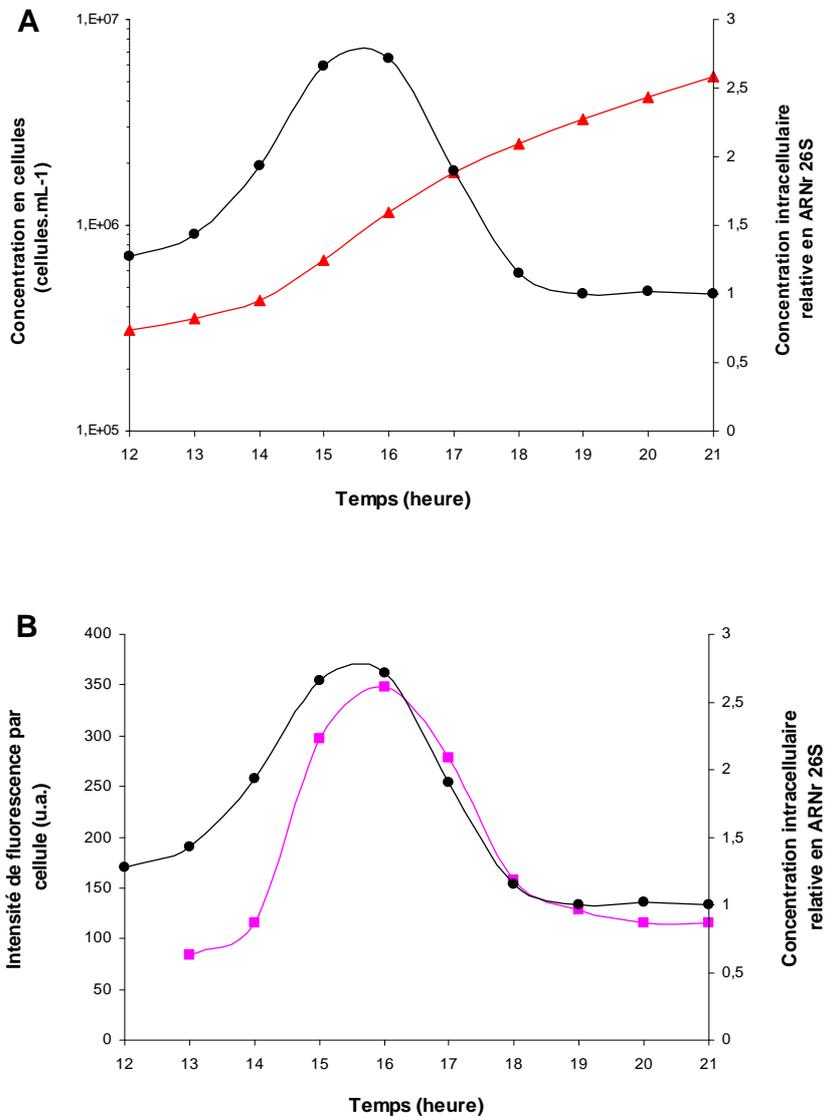


Figure 114 : Évolution de la concentration intracellulaire en ARNr 26S (●) lors de la croissance de *S. cerevisiae* (▲) en réacteur (A), et variation de l'intensité de fluorescence (■) (B).

La variation du taux de croissance des microorganismes durant cette période d'échantillonnage a également été déterminée en se basant sur le dénombrement effectué par cytométrie en flux (cf. Figure 115).

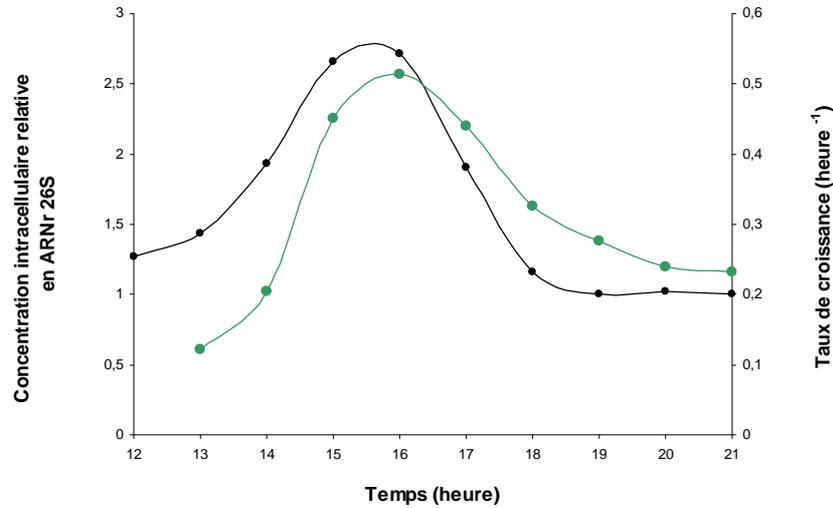


Figure 115 : Évolution de la concentration intracellulaire en ARNr 26S (●) et du taux de croissance des microorganismes (●) lors de la croissance de *S. cerevisiae* en réacteur.

Comme pour les deux souches bactériennes, l'évolution du taux de croissance lors de la culture de *S. cerevisiae* est en corrélation avec la concentration en ARNr des cellules. Après avoir atteint sa valeur maximale, la diminution du taux de croissance est moins brusque que celle de la concentration intracellulaire en ARNr 26S.

2.2.4 Conclusion

La quantification par RT-QPCR de l'ARNr lors des différents suivis de croissance a permis de mettre en évidence que les importantes variations de l'intensité de marquage FISH sont directement liées à une variation de la concentration intracellulaire en ARNr. Ce phénomène est identique chez des microorganismes phylogénétiquement très éloignés puisqu'il a été identifié chez des bactéries Gram-négatives et Gram-positives, ainsi que chez un microorganisme unicellulaire eucaryote, *S. cerevisiae*.

Des dosages de l'ARN total ont mis en évidence une variation de sa concentration intracellulaire au cours du cycle de croissance. La diminution de la concentration intracellulaire en ARN ribosomiques s'accompagne d'une baisse de la teneur en ARN

messagers et de transfert. Même si la concentration en ARNr dans la cellule diminue fortement. Ce dernier reste largement majoritaire et représente en permanence près de 80% du pool d'ARN total (Moss *et al.*, 2007). De plus, leur niveau d'expression est relativement stable par rapport à celui des autres gènes (*bglA*, *gap*, *rpoB*, ou encore *rplD*) habituellement utilisés comme référence pour la détermination du niveau d'expression génique (Tasara & Stephan, 2007).

Ces différents éléments considérés ensemble, permettent de dire que, malgré des variations indéniables de son niveau d'expression dans la cellule bactérienne, le gène 16S peut cependant être utilisé comme gène de référence lors de la détermination du niveau d'expression d'un gène par RT-QPCR

Une forte augmentation de la concentration en ARNr est observée à la fin de la phase de latence et au début de la phase exponentielle de croissance puis s'effondre très rapidement alors que la quantité de cellules continue à augmenter de façon exponentielle. Or, on pourrait s'attendre à ce que durant cette période, où la synthèse protéique et la production de biomasse sont intenses, les cellules aient besoin d'un stock important d'ARNr. Mais il semblerait que lors des premières heures du cycle de croissance, durant la phase de latence et le tout début de la phase exponentielle, les microorganismes synthétisent un important stock d'ARNr qui serait en large excès par rapport aux besoins de la cellule. Durant la phase de production intense de biomasse qui s'en suit, les cellules diminuent le taux de synthèse de la molécule qui se répartira entre les cellules filles à une concentration suffisante pour assurer la synthèse protéique. La division cellulaire entraînera alors une dilution de la teneur intracellulaire en ribosomes en rapport avec l'augmentation de la population cellulaire.

Les mesures d'intensité de fluorescence en FISH tout comme les dosages par RT-QPCR ciblent l'ARNr et non les ribosomes dans leur globalité. Cependant, dans le cas de *S. cerevisiae*, la sonde PF2 est dirigée contre l'ARNr de la SSU, l'ARNr 18S, alors que les amorces de QPCR ciblent l'ARNr de la LSU, l'ARNr 26S. Ces mesures obtenues par des techniques indépendantes montrent une coévolution pour les 2 types d'ARN constitutifs des ribosomes (cf. Figure 114 B). Ces éléments permettent donc de dire que c'est bien la concentration intracellulaire en ribosomes qui présente une décroissance marquée après que les cellules aient atteint leur taux de croissance maximum. Un dosage des protéines ribosomiques durant cette période permettrait de confirmer que les variations de la

concentration en ARNr, correspondent bien à celles de la quantité de ribosomes dans la cellule.

Ces résultats confirment que la technique d'hybridation fluorescente *in situ* n'est pas la mieux adaptée pour la quantification de microorganismes dans des échantillons complexes, et notamment les boues activées. La meilleure alternative semble être la PCR quantitative en temps réel. Cette technique ciblant l'ADN, dont la quantité par cellule est indépendante de son état physiologique, offre la possibilité de quantifier une population bactérienne précise.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

L'objectif principal de ces travaux était d'améliorer la compréhension des processus physiologiques et moléculaires impliqués dans le phénomène de filamentation de *Sphaerotilus natans*, bactérie modèle dans le foisonnement invasif des bactéries filamenteuses. Les différentes techniques de microbiologie, biologie moléculaire et biochimie utilisées et mises au point ont permis d'apporter des éléments de compréhension de ces mécanismes.

1 - Physiologie de la filamentation

a) Mode d'allongement des filaments

Les cultures lors de carence en azote, en présence d'un agent inhibiteur de la division cellulaire, ainsi que des suivis de la filamentation par cytométrie en flux et marquage au cFDA, ont permis de définir que l'allongement des filaments se fait essentiellement par divisions cellulaires et non par chaînage de cellules préexistantes.

Un regroupement des cellules en amas, ainsi que la formation de très courts filaments non gainés et constitués de quatre à six cellules ont été fréquemment observés lors de l'inhibition de la division cellulaire. Cette étape pourrait être un préalable indispensable à la constitution d'un filament long et gainé.

Ces expériences, couplées à des observations microscopiques, ont permis d'envisager la séquence d'événements suivante conduisant à la structuration du filament : sous l'effet d'un facteur inducteur, tel qu'une carence en oxygène, de petits groupes de cellules dispersées s'assemblent puis s'alignent en établissant des liaisons par leurs pôles apicaux pour former des protofilaments courts et non gainés. Les cellules synthétisent alors une matrice polysaccharidique formant une gaine. Le filament court gainé, s'allonge ensuite par divisions cellulaires en poursuivant la synthèse de sa gaine.

Une recherche de l'expression de molécules d'adhésion par les bactéries dispersées à leur surface ou la sécrétion de molécules de communication, en réponse à un stress induisant la filamentation, pourrait apporter des éléments de réponse supplémentaires.

Les mécanismes d'adhésion cellule à cellule, préalables à la formation de la gaine, sont d'un grand intérêt. Ils pourraient effectivement être les seuls mis en jeu chez les bactéries filamenteuses non-gainées. Parmi elles, *Nostocoida limicola*, *Microthrix parvicella* ou le Type 0092 sont souvent rencontrées dans des phénomènes de bulking. Ces espèces sont cependant peu étudiées car difficilement cultivables.

b) Induction différentielle de la filamentation chez différentes souches appartenant à l'espèce *S. natans*

Les expériences de cultures bactériennes effectuées au cours de ces travaux ont permis de montrer qu'un milieu carencé en nutriments ou en oxygène induit préférentiellement la croissance sous forme filamenteuse des souches de *S. natans*. Cependant, les tests de croissance en carence nutritionnel et en accessibilité réduite à l'oxygène, ont permis de distinguer deux groupes présentant une différence de sensibilité à ces facteurs inducteurs de la filamentation. Si les souches 13338T, 13929 et 15291 se développent sous forme de filaments sous l'effet d'un stress modéré, les souches 29329 et 29330, sont au contraire capables de se développer sous forme monocellulaire, même en cas de carences sévères.

Il est à noter que ces mêmes souches se distinguent apparemment des autres par leur séquence du gène *sthA*. Ce point reste à confirmer après séquençage exhaustif de ce gène chez toutes les espèces disponibles de *S. natans*.

Une étude des protéomes, visant à comparer les profils d'expression protéique de ces différentes souches, permettrait de préciser si ces différences de comportements sont le fruit d'équipements enzymatiques différents. Le produit du gène *sthA* y serait notamment recherché.

c) **Mise en évidence de la variation de la concentration en ARNr intracellulaire lors de la croissance des microorganismes et de son impact sur la technique FISH.**

Des mesures de la quantité d'ARNr intracellulaire par RT-QPCR croisées à des analyses de l'intensité du signal FISH par cytométrie en flux, ont permis de mettre en évidence qu'une variation de la concentration en ARNr entraîne une importante variation de l'intensité de fluorescence du signal FISH au cours du cycle de croissance de *S. natans*, mais aussi de *L. delbruekii* et *S. cerevisiae*.

Ces variations de l'intensité, observées en culture pure, vont avoir un impact considérable sur la quantification de microorganismes par FISH, notamment en matrice complexe telle que les boues activées.

La bactérie *S. natans* étant capable d'adopter de façon réversible la forme filamenteuse ou monocellulaire, une hypothèse selon laquelle les filaments seraient capables de repasser à l'état dispersé grâce à un phénomène de déstructurations des filaments a été émise (Gaval, 2001). Les résultats ayant conduit à cette analyse sont basés sur une quantification des filaments par l'intermédiaire de la technique FISH. Dans le cadre de ces travaux, les biais que peut présenter cette technique pour la quantification des micro-organismes ont été démontrés. Cette hypothèse, qui pourrait avoir été induite par une sous-estimation des effectifs filamenteux, est donc remise en cause.

Une comparaison de la quantification de *S. natans* par FISH et QPCR pourrait être réalisée sur des cultures et des boues activées pour lesquelles des phases de prolifération filamenteuse seraient induites. Il serait ainsi possible de voir si les estimations des populations diffèrent pour les deux techniques, et de vérifier s'il y a réellement une chute des effectifs filamenteux après arrêt d'un stress.

2 - Mécanismes moléculaires impliqués dans la filamentation

a) **Expression du gène *sthA* lors de la filamentation**

sthA est le seul gène impliqué dans le processus de filamentation actuellement identifié (Suzuki *et al.*, 2002). Depuis sa découverte, ce gène n'a fait l'objet d'aucune autre étude.

Des mesures de l'expression génique par RT-QPCR nous ont permis de montrer que le gène *sthA* est plus exprimé par la forme filamenteuse de la bactérie. De plus son niveau d'expression reste élevé tout au long de la croissance des filaments, indiquant que ce gène n'a pas de fonction régulatrice du processus de filamentation, mais qu'il intervient directement dans la synthèse du trichome. Ceci implique l'existence d'autres gènes impliqués dans la synthèse de la gaine et présentant des fonctions régulatrices sensibles aux facteurs inducteurs.

Ces travaux ont également permis de démontrer la présence de ce gène chez toutes les souches de *S. natans*. Il a été cloné et séquencé, au moins en partie, pour chacune des souches précédemment citées ainsi que pour la souche qui a été isolée à partir de boues activées par une méthode de micromanipulation mise au point lors de ces travaux. La recherche de ce gène dans d'autres microorganismes a permis de montrer que sa séquence semble être très spécifique de cette espèce bactérienne.

Une méthode de quantification par QPCR de *S. natans* dans les boues activées basée sur l'utilisation du gène *sthA* a également été mise au point dans le cadre de ces travaux. La mise au point d'un panel d'amorces, ciblant le gène de l'ARNr 16S ou des gènes de fonction à l'image de *sthA*, pour les différents microorganismes filamenteux des boues activées est à poursuivre. Elle permettrait d'obtenir rapidement un profil précis, en termes de diversité et d'abondance, de la population filamenteuse des boues activées.

L'identification et la caractérisation de la protéine pour laquelle code le gène *sthA* permettrait d'avancer dans la compréhension du mécanisme de la filamentation. Il est très probable que cette dernière intervienne directement dans la mise en place de la gaine entourant le trichome, soit au niveau de la synthèse du polysaccharide, soit au niveau de sa structuration.

La recherche du gène *sthA*, ou d'un gène homologue, pourrait être réalisée chez un plus grand nombre d'espèces bactériennes afin de déterminer s'il est véritablement spécifique de *S. natans*.

b) Étude de la gaine polysaccharidique des filaments de *S. natans*

Afin de préciser la nature de la gaine entourant le filament de *S. natans*, un protocole associant des traitements physiques et chimiques, a été défini pour permettre son extraction et sa purification.

Il a ainsi été démontré que les protéines incluses dans cette gaine jouent un rôle essentiel dans la structure du peptidoglycane. En effet, un traitement au β -mercaptoéthanol, provoquant la rupture des ponts disulfures entre les cystéines, conduit à la déstructuration et à la solubilisation du polymère.

Une analyse précise de la composition et de la structure du polysaccharide permettrait de rechercher des enzymes impliquées dans sa synthèse et de rechercher leur présence dans le protéome du génome de la bactérie.

La recherche et l'analyse des résidus de dégradation du polysaccharide lors d'un retour à des conditions de culture favorables au microorganisme, pourraient permettre d'identifier une ou plusieurs enzymes propre(s) à *S. natans*, pouvant dégrader ou déstructurer la gaine. Leur présence serait également à rechercher dans le protéome de *S. natans*.

c) Détermination de protéines impliquées dans la filamentation par approche protéomique

Une approche associant la séparation des protéines par SDS-PAGE et des analyses par LC-MS-MS a permis d'identifier des protéines dont le niveau d'expression varie de façon significative entre les deux morphologies adoptées par *S. natans*. La plupart d'entre elles sont soit des protéines de stress, soit des enzymes qui semblent être impliquées dans la synthèse de la gaine entourant le filament.

Une analyse de l'expression protéique au cours de différents stades de la formation du filament permettrait de pouvoir identifier de façon exhaustive les protéines impliquées dans les mécanismes de filamentation.

Une séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle préalable à une analyse par LC-MS-MS permettrait une identification plus efficace de ces protéines. Les séquences des gènes correspondants devront être recherchées dans les bases de données regroupant des micro-organismes proches. Elles permettront de définir des jeux d'amorces susceptibles d'amplifier les gènes candidats chez *S. natans*.

Une approche *de novo* dans l'analyse des données obtenues par spectrométrie de masse permettrait d'identifier des protéines absentes des bases de données ou présentant des variations de séquences trop importantes.

Jusqu'à maintenant, le traitement du bulking par chloration était une solution tout à fait satisfaisante pour les exploitants de stations d'épuration, aussi bien pour son efficacité que pour son coût modéré. Cependant, cette solution est amenée à disparaître en raison de la nocivité de certains résidus chlorés. La compréhension de ce phénomène de filamentation, pour *S. natans*, mais également pour d'autres bactéries filamenteuse plus fréquemment impliquées dans les épisodes de bulking, est indispensable à la mise au point d'un traitement efficace de lutte comme le foisonnement filamenteux plus sélectif et moins nocif pour l'environnement.

Références Bibliographiques

A

Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Schuler, D., Poralla, K. & Petersen, N. (1995). Phylogenetic analysis of uncultured magnetotactic bacteria from the alpha-subclass of Proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 501-508.

Amann, R. & Ludwig, W. (2000). Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 555-565.

Amann, R., Fuchs, B. M. & Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* **12**, 231-236.

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R. & Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1919-1925.

B

Bahr, H. (1953). Zur Biologie von *Sphaerotilus natans* Kützing. *Aquatic Sciences - Research Across Boundaries* **15**, 285-301.

Begg, K. J., Tomoyasu, T., Donachie, W. D., Khattar, M., Niki, H., Yamanaka, K., Hiraga, S. & Ogura, T. (1992). *Escherichia coli* mutant Y16 is a double mutant carrying thermosensitive ftsH and ftsI mutations. *Journal of Bacteriology* **174**, 2416-2417.

Bieman, K. (1990). Methods in enzymology. pp. 455-479. Edited by A. Press. New-York.

Binder, B. J. & Liu, Y. C. (1998). Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (cyanobacterium) strain. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3346-3351.

Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J. & Litt, G. J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *Journal of Immunological Methods* **125**, 279-285.

Buali, A. M. & Horan, N. J. (1989). Variable morphology in certain filamentous bacteria and the implications of this for theories of activated sludge bulking. *Environmental Technology Letters* **10**, 941-950.

Byoung, C. K., Ji, H. P. & Man, B. G. (2004). Development of a DNA microarray chip for the identification of sludge bacteria using an unsequenced random genomic DNA hybridization method. *Environmental Science and Technology* **38**, 6767-6774.

C

Chen, C. R., Malik, M., Snyder, M. & Drlica, K. (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: Quinolone-induced DNA cleavage. *Journal of Molecular Biology* **258**, 627-637.

Chudoba, J., Grau, P. & Ottova, V. (1973). Control of activated sludge filamentous bulking. II. Selection of microorganisms by means of a selector. *Water Research* **7**, 1389-1406.

Chudoba, J., Blaha, J. & Madera, V. (1974). Control of activated sludge filamentous bulking. III. Effect of sludge loading. *Water Research* **8**, 231-237.

Crombach, W. H. J., Van Veen, W. L., Van Der Vlies, A. W. & Bots, W. C. P. M. (1974). DNA base composition of some sheathed bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **40**, 217-220.

Crumplin, G. C. & Smith, J. T. (1976). Nalidixic acid and bacterial chromosome replication. *Nature* **260**, 643-645.

D

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K. H. & Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 434-444.

Daims, H., Lückner, S. & Wagner, M. (2006). Daime, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environmental Microbiology* **8**, 200-213.

Daims, H. & Wagner, M. (2007). Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 237-248.

Degrémont (1989). *Mémento technique de l'eau*, 9ème edn: Lavoisier.

Duchène, P. (1994). Dysfonctionnements biologiques dans les stations d'épuration en boues activées. In *POLLUTECH 94*. Edited by C. édition. Lyon.

Dumoncaux, T. J., Hill, J. E., Pelletier, C. P., Paice, M. G., Van Kessel, A. G. & Hemmingsen, S. M. (2006). Molecular characterization of microbial communities in Canadian pulp and paper activated sludge and quantification of a novel *Thiothrix eikelboomii*-like bulking

filament. *Canadian Journal of Microbiology* **52**, 494-500.

E

Eikelboom, D. H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Research* **9**, 365-388.

Eikelboom, D. H., Andreadakis, A. & Andreasen, K. (1998). Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries. *Water Science and Technology* **37**, 281-289.

Eikelboom, D. H. (2000). *Process Control of Activated Sludge Plants by Microscopic Investigation*. London: IWA Publishing.

Eikelboom, D. H. (2006). *Filamentous Micro-organisms in Industrial Wastewater Treatment Plants*. London: IWA Publishing.

Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R. J., Amann, R. & Blackall, L. L. (1997). Development and use of fluorescent *in situ* hybridization probes for the detection and identification of '*Microthrix parvicella*' in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 310-318.

Esposito, A., Pagnanelli, F., Lodi, A., Solisio, C. & Veglio, F. (2001). Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: An equilibrium study at different pH and biomass concentrations. *Hydrometallurgy* **60**, 129-141.

F

Fenn, J. B. (1984). Electrospray Ion (ESPI) source as an LC-MS interface. In *Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, pp. 92-93.

Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.

Fisher, M. M. & Triplett, E. W. (1999). Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4630-4636.

FNDAE (2005). Dysfonctionnements des stations d'épuration : origines et solutions FNDAE N°33.

Foot, R. J., Kocianova, E. & Forster, C. F. (1992). Variable morphology of *Microthrix parvicella* in activated sludge systems. *Water Research* **26**, 875-880.

Fröhlich, J. & König, H. (1999). Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. *Systematic and Applied Microbiology* **22**, 249-257.

Fröhlich, J. & König, H. (2000). New techniques for isolation of single prokaryotic cells. *FEMS Microbiology Reviews* **24**, 567-572.

Fujiwara, K. & Taguchi, H. (2007). Filamentous Morphology in GroE-Depleted *Escherichia coli* Induced by Impaired Folding of FtsE. *J Bacteriol* **189**, 5860-5866.

Fuller, M. E., Streger, S. H., Rothmel, R. K., Mailloux, B. J., Hall, J. A., Onstott, T. C., Fredrickson, J. K., Balkwill, D. L. & Deflaun, M. F. (2000). Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4486-4496.

Fuller, M. E., Mailloux, B. J., Zhang, P. et al. (2001). Field-scale evaluation of cFDA/SE staining coupled with multiple detection methods for assessing the transport of bacteria *in situ*. *FEMS Microbiology Ecology* **37**, 55-66.

G

Gagiano, M., Bauer, F. F. & Pretorius, I. S. (2002). The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **2**, 433-470.

Gaudy, E. & Wolfe, R. S. (1961). Composition of an extracellular polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*. *Applied Microbiol.* **9**, 580-584.

Gaval, G., Morin, L., Simonet, J. M., Leblon, G., Duchene, P. & Pernelle, J. J. (2000). Influence des à-coups de charge sur la prolifération des bactéries filamenteuses dans les boues activées. In *1st congress of IWA, Paris, 3-7 juillet 2000, poster CD ROM*, pp. 4 p. PARIS.

Gaval, G. (2001). Influence des carences en oxygène sur la prolifération des bactéries filamenteuses en boues activées, pp. 196, Mémoire de Thèse : Université PARIS XI ORSAY.

Gaval, G., Duchene, P. & Pernelle, J. J. (2002). Filamentous bacterial population dominance in activated sludges subject to stresses. *Water Science and Technology* **46**, 49-53.

Gaval, G. & Pernelle, J. J. (2003). Impact of the repetition of oxygen deficiencies on the filamentous bacteria proliferation in activated sludge. *Water Research* **37**, 1991-2000.

Gibson, U. E. M., Heid, C. A. & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* **6**, 995-1001.

Graveleau, L., Cotteux, E. & Duchene, P. (2005). Bulking and foaming in France: The 1999-2001 survey. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* **33**, 223-231.

H

Hahn, M. W., Moore, E. R. B. & Höfle, M. G. (1999). Bacterial filament formation, a defense mechanism against flagellate grazing, is growth rate controlled in bacteria of different phyla. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 25-35.

Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. & Sayler, G. S. (2003). Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology* **37**, 343-351.

Hawkey, P. M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 29-35.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., Gonzalez, A., Mas, A. & Guillamon, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 7148-7155.

Hoefel, D., Grooby, W. L., Monis, P. T., Andrews, S. & Saint, C. P. (2003). A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. *Journal of Microbiological Methods* **52**, 379-388.

Hoeniger, J. F., Tauschel, H. D. & Stokes, J. L. (1973). The fine structure of *Sphaerotilus natans*. *Canadian Journal of Microbiology* **19**, 309-313.

Howarth, R., Unz, R. F., Seviour, E. M., Seviour, R. J., Blackall, L. L., Pickup, R. W., Jones, J. G., Yaguchi, J. & Head, I. M. (1999). Phylogenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (*Thiothrix* spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of *Thiothrix eikelboomii* sp. nov., *Thiothrix unzii* sp. nov., *Thiothrix fructosivorans* sp. nov. and *Thiothrix defluvii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 1817-1827.

Hug, T., Gujer, W. & Siegrist, H. (2005). Rapid quantification of bacteria in activated sludge using fluorescence *in situ* hybridization and epifluorescence microscopy. *Water Research* **39**, 3837-3848.

Hwang, D. S., Crooke, E. & Kornberg, A. (1990). Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein. *J Biol Chem* **265**, 19244-19248.

I

Ishøy, T., Kvist, T., Westermann, P. & Ahring, B. K. (2006). An improved method for single cell isolation of prokaryotes from meso-, thermo- and hyperthermophilic environments using micromanipulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**, 510-514.

Itoh, R., Takano, H., Ohta, N., Miyagishima, S. Y., Kuroiwa, H. & Kuroiwa, T. (1999). Two ftsH-family genes encoded in the nuclear and chloroplast genomes of the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Molecular Biology* **41**, 321-337.

J

Jenkins, D., Richard, M. G. & Daiggert, G. T. (1984). *Manual of the Causes and Control of Activated Sludge Foaming and Bulking*, 1st edn: Lewis Publishers.

Jenkins, D., Richard, M. & Daiggert, G. T. (2003). *Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solid separation problems.*, 3rd edn: Lewis publisher.

Johnson, A. H. & Stokes, J. L. (1966). Manganese oxidation by *Sphaerotilus discophorus*. *Journal of Bacteriology* **91**, 1543-1547.

Ju, Q. & Warner, J. R. (1994). Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 151-157.

K

Kaetzke, A., Jentsch, D. & Eschrich, K. (2005). Quantification of *Microthrix parvicella* in activated sludge bacterial communities by real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 207-211.

Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M. & Wagner, M. (2000). Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5043-5052.

Kaziro, Y. (1978). The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochimica et Biophysica Acta* **505**, 95-127.

Kerkhof, L. & Ward, B. B. (1993). Comparison of nucleic acid hybridization and fluorometry for measurement of the relationship between RNA/DNA ratio and

growth rate in a marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1303-1309.

Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **25**, 415-420.

Kowalchuk, G. A., Stephen, J. R., De Boer, W., Prosser, J. I., Embley, T. M. & Woldendorp, J. W. (1997). Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1489-1497.

Krab, I. M. & Parmeggiani, A. (2002). Mechanisms of EF-Tu, a pioneer GTPase. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, pp. 513-551.

Kragelund, C., Kong, Y., van der Waarde, J., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Thomsen, T. R. & Nielsen, P. H. (2006). Ecophysiology of different filamentous Alphaproteobacteria in industrial wastewater treatment plants. *Microbiology* **152**, 3003-3012.

Kragelund, C., Levantesi, C., Borjer, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., Krooneman, J., Larsen, P., Thomsen, T. R., Nielsen, P. H. (2008). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous bacteria belonging to the *bacteroidetes* present in activated sludge plants. *Microbiology* **154**, 886-894.

L

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

Levantesi, C., Beimfohr, C., Geurking, B., Rossetti, S., Thelen, K., Krooneman, J., Snaidr, J., Van der Waarde, J., Tandoï, V. (2004). Filamentous *Alphaproteobacteria* associated with Bulking in industrial wastewater treatment plants. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 716-727.

Levantesi, C., B., Rossetti, S., Thelen, K., Kragelund, C., Krooneman, J., Eikelboom, D., Nielsen, P. H., Tandoï, V. (2006). Phylogeny, physiology and distribution of 'Candidatus *Microthrix calida*', a new *Microthrix* species isolated from industrial activated sludge wastewater treatment plants. *Environmental Microbiology* **8(9)** 1552-1563.

Liu, J. R. & Seviour, R. J. (2001). Design and application of oligonucleotide probes for fluorescent *in situ* identification of the filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola* in activated sludge. *Environmental Microbiology* **3**, 551-560.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* **25**, 402-408.

Lodi, A., Solisio, C., Converti, A. & Del Borghi, M. (1998). Cadmium, zinc, copper, silver and chromium(III) removal from wastewaters by *Sphaerotilus natans*. *Bioprocess Engineering* **19**, 197-203.

M

Madoni, P., Davoli, D. & Gibin, G. (2000). Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated- sludge plants in Italy. *Water Research* **34**, 1767-1772.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. & Schleifer, K. H. (1992).

Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Systematic and Applied Microbiology* **15**, 593-600.

Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C., Hiom, S. J. & Wade, W. G. (1998). Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 795-799.

Martin, J. U. F. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 41-52.

Masuzawa, T., Shimizu, T., Yanagihara, Y. & Mifuchi, I. (1987). Macrophage activation and immunostimulating activity of *Sphaerotilus natans* and its slime fraction. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **35**, 2004-2010.

Mattick, K. L., Jørgensen, F., Legan, J. D., Cole, M. B., Porter, J., Lappin-Scott, H. M. & Humphrey, T. J. (2000). Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 at low water activity. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1274-1279.

Maurines-Carboneill, C., Morin, L., Pernelle, J. J., Derlet, N., Sachon, G. & Leblon, G. (1998). Reviviscence of aerobic chemoheterotrophic bacteria in an activated sludge pilot plant after a prolonged absence of oxygen. *Water Research* **32**, 2211-2219.

Mechsner, K. (1983). The influence of the dissolved oxygen concentration on the physiology and ecology of *Sphaerotilus natans* Kütz. *Oecologia* **60**, 18-20.

Mifuchi, I., Masuzawa, T. & Koike, M. (1985). Antitumor activity of *Sphaerotilus natans* and its slime fraction in mice. *Japanese Journal of Cancer Research* **76**, 657-662.

Morillon, A., Springer, M. & Lesage, P. (2000). Activation of the Kss1 invasive-filamentous growth pathway induces Ty1 transcription and retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 5766-5776.

Morlot, C., Noirclerc-Savoie, M., Zapun, A., Dideberg, O. & Vernet, T. (2004). The D,D-carboxypeptidase PBP3 organizes the division process of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **51**, 1641-1648.

Moss, T., Langlois, F., Gagnon-Kugler, T. & Stefanovsky, V. (2007). A housekeeper with power of attorney: The rRNA genes in ribosome biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**, 29-49.

Müller, E., Schade, M. & Lemmer, H. (2007). Filamentous Scum Bacteria in Activated Sludge Plants: Detection and Identification Quality by Conventional Activated Sludge Microscopy versus Fluorescence *In Situ* Hybridization. *Water Environment Research* **79**, 2274-2286.

Mullis, K. B., Faloona F. A. (1986). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.

Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.

N

Naumann, E. (1933). Ist *Cladotrix dichotoma* Cohn 1875 mit *Sphaerotilus natans* Kutzing 1833 identisch. *Zentr Bakteriolog Parasitenk Abt* **2**, 62-66.

O

Ogino, H., Wachi, M., Ishii, A., Iwai, N., Nishida, T., Yamada, S., Nagai, K. & Sugai, M. (2004). FtsZ-dependent localization of GroEL protein at possible division sites. *Genes to Cells* **9**, 765-771.

Olivier, F. (2005). Expression de l'activité des bactéries nitrosantes issues de stations d'épuration en milieu Seine - Etude en réacteurs. Paris XI Orsay. Mémoire de Thèse.

P

Pagnanelli, F., Esposito, A., Toro, L. & Veglio, F. (2003). Metal speciation and pH effect on Pb, Cu, Zn and Cd biosorption onto *Sphaerotilus natans*: Langmuir-type empirical model. *Water Research* **37**, 627-633.

Palm, J. C., Jenkins, D. & Parker, D. S. (1980). Relationship between organic loading, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in the completely-mixed activated sludge process. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **52**, 2484-2506.

Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski, B. H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**, 1127-1130.

Pernelle, J. J., Cotteux, E. & Duchene, P. (1998). Effectiveness of oligonucleotides probes targeted against *Thiothrix nivea* and Type 021N 16S rRNA for *in situ* identification and population monitoring of activated sludges. *Water science & technology* **37**, n°4-5, p. 431-440.

Pernelle, J. J., Gaval, G., Cotteux & Duchene, P. (2001). Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Water Research* **35**, 129-134.

Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F. & Baquero, F. (1987). Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **20**, 631-638.

Poulsen, L. K., Ballard, G. & Stahl, D. A. (1993). Use of rRNA fluorescence *in situ* hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 1354-1360.

Pujol, R. (1987). Maitrise du foisonnement des boues activées : biosorption et zones de contact. Approche méthodologique., pp. 154. Lyon: INSA.

Q

Qin, Y. C., Guan, X. H., Wei, D. Z. & Shen, Y. B. (2005a). Isolation of *Sphaerotilus natans* and its biosorption of Pb²⁺. *Dongbei Daxue Xuebao/Journal of Northeastern University* **26**, 687-690.

Qin, Y. C., Guan, X. H., Yin, R., Wang, L. W. & Wei, D. Z. (2005b). Preliminary research on Cd²⁺ removal from wastewater by *Sphaerotilus natans*. *Chemical Research in Chinese Universities* **21**, 654-657.

R

Radcliffe, P. A., Binley, K. M., Trevethick, J., Hall, M. & Sudbery, P. E. (1997). Filamentous growth of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* induced by overexpression of the WHI2 gene. *Microbiology* **143**, 1867-1876.

Ramothokang, T. R., Naidoo, D. & Bux, F. (2006). Morphological shifts' in filamentous bacteria isolated from activated sludge processes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22**, 845-850.

Rhodes, E. R., Menke, S., Shoemaker, C., Tomaras, A. P., McGillivray, G. & Actis, L. A. (2007). Iron acquisition in the dental pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: What does it use as a source and how does it get this essential metal? *BioMetals* **20**, 365-377.

Richard, M., Hao, O. & Jenkins, D. (1985). Growth kinetics of *Sphaerotilus* species and their significance in activated sludge bulking. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **57**, 68-81.

Rossetti, S., Hildisch, D., Christensson, C., Del Dot, T., Blackall, L. L. & Tandoi, V. (1997). Isolation and identification of an Eikelboom type 1863 strain as *Acinetobacter johnsonii*. *Water Research* **31**, 657-660.

Rossetti, S., Tomei, M. C., Levantesi, C., Ramadori, R. & Tandoi, V. (2002). "*Microthrix parvicella*": A new approach for kinetic and physiological characterization. *Water Science and Technology* **46**, 65-72.

Rossetti, S., Tomei, M. C., Nielsen, P. H., Tandoi, V. (2005). "Microthrix parvicella", a filamentous bacterium causing bulking and foaming in activated sludge systems: a review of current knowledge. *FEMS Microbiology Review* **29**, 49-64.

Rossetti, S., Tomei, M. C., Blackall, L. L. & Tandoi, V. (2007). Bacterial growth kinetics estimation by fluorescence *in situ* hybridization and spectrofluorometric quantification. *Letters in Applied Microbiology* **44**, 643-648.

Ruimy, R. & Andremont, A. (2004). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation* **13**, 176-184.

S

Sanz, J. L. & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: An overview. *Process Biochemistry* **42**, 119-133.

Sbai, M. & Alix, J. H. (1998). DnaK-dependent ribosome biogenesis in *Escherichia coli*: Competition for dominance between the alleles dnaK756 and dnaK+. *Molecular and General Genetics* **260**, 199-206.

Scheuring, L. & Höhl, G. (1956). *Sphaerotilus natans* - seine ökologie und physiologie: Darmstadt.

Schönhuber, W., Zarda, B., Eix, S., Rippka, R., Herdman, M., Ludwig, W. & Amann, R. (1999). *In situ* identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 1259-1267.

Schuurman, T., De Boer, R. F., Kooistra-Smid, A. M. D. & Van Zwet, A. A. (2004). Prospective Study of Use of PCR Amplification and Sequencing of 16S Ribosomal DNA from Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Bacterial Meningitis in a Clinical Setting. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 734-740.

Seviour, E. M., Williams, C., DeGrey, B., Soddell, J. A., Seviour, R. J. & Lindrea, K. C. (1994). Studies on filamentous bacteria from Australian activated sludge plants. *Water Research* **28**, 2335-2342.

Seviour, R. J., Liu, J. R., Seviour, E. M., Mckenzie, C. A., Blackall, L. L. & Saint, C. P. (2001). The *Nostocoida limicola* story: resolving the phylogeny of this morphotype responsible for bulking in activated sludge. In *3rd IWA International Specialised Conference on Microorganisms in activated sludge and biofilm processes*, pp. 68-74. Rome.

Sezgin, M., Jenkins, D. & Parker, D. S. (1978). A unified theory of filamentous activated sludge bulking. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **50**, 362-381.

She, C., Xu, X., Shen, X. & Li, H. (2005). Biosorption and tolerance of *Sphaerotilus natans* to heavy metal ion. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* **11**, 90-92.

Siering, P. L. & Ghiorse, W. C. (1996). Phylogeny of the *Sphaerotilus-Leptothrix* group inferred from morphological comparisons, genomic fingerprinting, and 16S ribosomal DNA sequence analyses. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 173-182.

Skerman, V. B. (1968). A new type of micromanipulator and microforge. *Journal of General Microbiology* **54**, 287-297.

Solisio, C., Lodi, A., Converti, A. & Del Borghi, M. (2000). The effect of acid pre-treatment on the biosorption of chromium(III) by *Sphaerotilus natans* from industrial wastewater. *Water Research* **34**, 3171-3178.

Stoffel, W. & Caesar, H. (1965). Metabolism of unsaturated fatty acids. V. On the beta-oxidation of mono- and polyene-fatty acids. Mechanism of enzymatic reactions of delta-2-cis-enoyl-CoA compounds. *Z Physiol Chem* **341**, 76-83.

Stokes, J. L. (1954). Studies on the filamentous sheathed iron bacterium *Sphaerotilus natans*. *J Bacteriol* **67**, 278-291.

Strom, P. F. & Jenkins, D. (1984). Identification and significance of filamentous microorganisms in activated sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation* **56**, 449-459.

Suzuki, T., Kanagawa, T. & Kamagata, Y. (2002). Identification of a gene essential for sheathed structure formation in *Sphaerotilus natans*, a filamentous sheathed bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 365-371.

T

Tabb, D. L., Eng, J. K. & Yates, J. R. (2001). Protein identification by SEQUEST. In *Proteom research : Mass spectrometry*, pp. 125-142. Edited by J. P. New-York: Springer.

Takeda, M., Nakano, F., Nagase, T., Iohara, K. & Koizumi, J. I. (1998). Isolation and Chemical Composition of the Sheath of *Sphaerotilus natans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**, 1138-1143.

Takeda, M., Iohara, K., Shinmaru, S., Suzuki, I. & Koizumi, J. I. (2000). Purification and properties of an enzyme capable of degrading the sheath of *Sphaerotilus natans*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4998-5004.

Takeda, M., Kamagata, Y., Shinmaru, S., Nishiyama, T. & Koizumi, J. I. (2002a). *Paenibacillus koleovorans* sp. nov., able to grow on the sheath of *Sphaerotilus natans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1597-1601.

Takeda, M., Nishiyama, T., Nomoto, S., Shinmaru, S., Suzuki, I. & Koizumi, J. I. (2002b). Commensal relationship between a sheath-forming bacterium, *Sphaerotilus natans*, and a sheath-degrading bacterium, *Paenibacillus* sp. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**, 458-463.

Takeda, M., Nomoto, S. & Koizumi, J. I. (2002c). Structural analysis of the extracellular polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **66**, 1546-1551.

Takeda, M., Nakamori, T., Hatta, M., Yamada, H. & Koizumi, J. I. (2003a). Structure of the polysaccharide isolated from the sheath of *Sphaerotilus natans*. *International Journal of Biological Macromolecules* **33**, 245-250.

Takeda, M., Nishina, K., Hanaoka, Y., Higo, M., Terui, M., Suzuki, I. & Koizumi, J. I. (2003b). A novel gene encoding an enzyme that degrades a polysaccharide from the sheath of *Sphaerotilus natans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**, 2300-2303.

Takeda, M., Suzuki, I. & Koizumi, J. I. (2005). *Paenibacillus hodogayensis* sp. nov., capable of degrading the polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 737-741.

Tam, R. & Saier, M. H., Jr. (1993). Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **57**, 320-346.

Tandoi, V., Caravaglio, N., Di Dio Balsamo, D., Majone, M. & Tomei, M. C. (1994). Isolation and physiological characterization of *Thiothrix* sp. *Water Science and Technology* **29**, 261-269.

Tasara, T. & Stephan, R. (2007). Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS Microbiology Letters* **269**, 265-272.

U

Ueckert, J. E., Nebe Von-Caron, G., Bos, A. P. & Ter Steeg, P. F. (1997). Flow cytometric analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitor lag times, cell division and injury. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 295-299.

V

Van Veen, W. L., Mulder, E. G. & Deinema, M. H. (1978). The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria. *Microbiological Reviews* **42**, 329-356.

Vervaeren, H., De Wilde, K., Matthys, J., Boon, N., Raskin, L. & Verstraete, W. (2005). Quantification of an Eikelboom type 021N bulking event with fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR.

Applied Microbiology and Biotechnology **68**, 695-704.

Vinh, J. (1999). Etude et caractérisation structurale de modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse.: Université Pierre et Marie Curie-PARIS 6. Mémoire de Thèse.

W

Wagner, J. (1994). Filamentous microorganisms in activated sludge. In *Activated sludge bulking and foaming control*, pp. 129-206: Technomic publishing company.

Wagner, M., Amann, R., Kampf, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N. & Schleifer, K. H. (1994). Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology* **17**, 405-417.

Waldron, C. & Lacroute, F. (1975). Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *Journal of Bacteriology* **122**, 855-865.

Wallner, G., Erhart, R. & Amann, R. (1995). Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1859-1866.

Wanner, J. & Grau, P. (1989). Identification of filamentous microorganisms from activated sludge. A compromise between wishes, needs and possibilities. *Water Research* **23**, 883-891.

Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 437-440.

Wehrl, W., Niederweis, M. & Schumann, W. (2000). The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *Journal of Bacteriology* **182**, 3870-3873.

Weller, R., Glöckner, F. O. & Amann, R. (2000). 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for the *in situ* detection of members of the phylum *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*. *Systematic and Applied Microbiology* **23**, 107-114.

Worden, A. Z. & Binder, B. J. (2003). Growth regulation of rRNA content in *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Marine Cyanobacteria) measured by whole-cell hybridization of rRNA-targeted peptide nucleic acids. *Journal of Phycology* **39**, 527-534.

Y

Yates 3rd, J. R., Carmack, E., Hays, L., Link, A. J. & Eng, J. K. (1999). Automated protein identification using microcolumn liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* **112**, 553-569.

Z

Zeng, R. J., Saunders, A. M., Yuan, Z., Blackall, L. L. & Keller, J. (2003). Identification and comparison of aerobic and denitrifying polyphosphate-accumulating organisms. *Biotechnology and Bioengineering* **83**, 140-148.

Zybaylov, B., Coleman, M. K., Florens, L. & Washburn, M. P. (2005). Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and spectrum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope

labeling. *Analytical Chemistry* **77**, 6218-6224.

ANNEXES

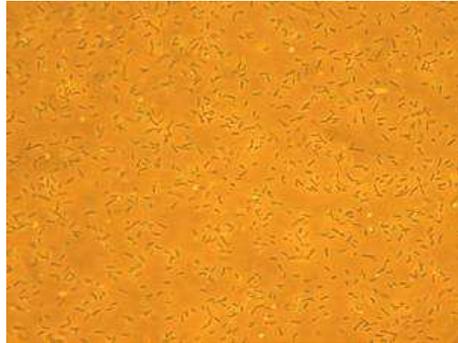
ANNEXE 1

Illustrations des morphologies adoptées par les différentes souches de *S. natans* lors de culture sur Gélose et bouillon CGYA

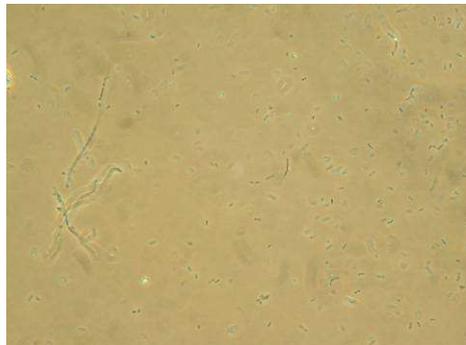
Gélose CGYA

Bouillon CGYA

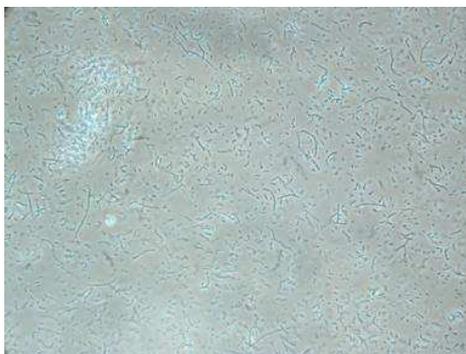
13338T



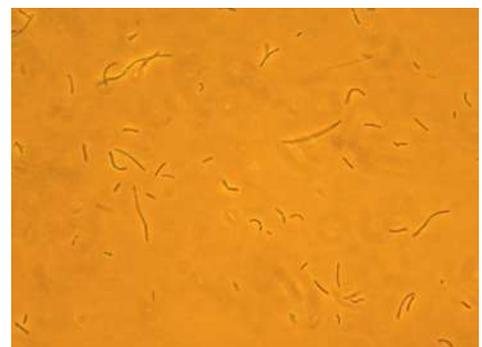
13929



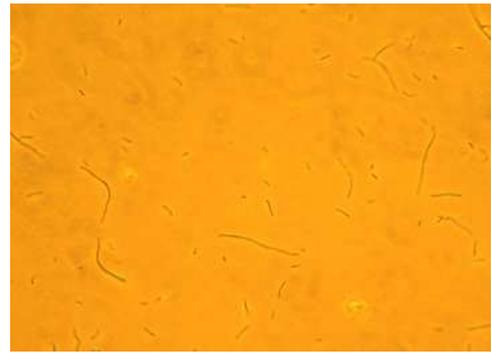
15291



29329



29330

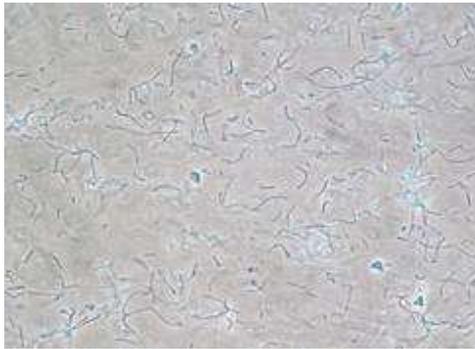


Illustrations des morphologies adoptées par les différentes souches de *S. natans* lors de culture sur Gélose et bouillon NB 0,5%

Gélose NB 0,5%

Bouillon 0,5%

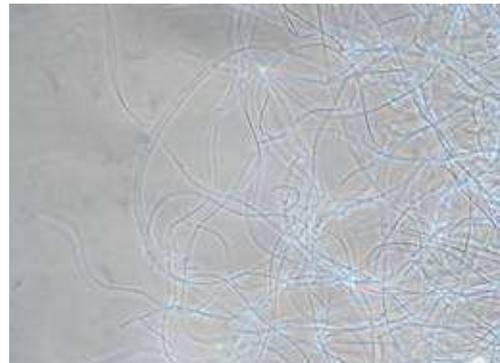
13338T



13929



15291



29329



29330



Les observations ont été effectuées au grossissement 500 sur un microscope Leitz Laborlux S équipé d'un appareil photo numérique possédant un zoom optique 12x pour l'acquisition des images.

ANNEXE 2

Composition du Milieu PCA :

- Tryptone..... 5g
- Extrait de levure.....2,5g
- Glucose.....1g
- Agar.....15g
- Eau.....1L

La gélose PCA est vendue prête à l'emploi.

Dissoudre 23,5 grammes de milieu lyophilisé dans 1 litre d'eau distillée.

Stérilisation du milieu par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

ANNEXE 3

Positionnement des deux couples d'amorces utilisés en PCR quantitative sur la séquence AB050638 incluant le gène *sthA*

```
1 GAAGACACAC GCTGATTTGT ACGCATCTGT TGACGCAGTT GGTACAAGTC TTCACTCTCA
61 CGTCAATACG TCACACAATC GTGCTCCAGT CTCCCCTGCT TGGGGGAATG AGGGTGCCCG
121 TGCATCAGGC GCCAGGGAGT CAGGGTCGAA AATCAGGGGG TCAGCAATGA TGGCTCCAG
181 TCCTGCGCAA GTGACGCGAG ACGCATTGCC AGTGTTTTGC CAAGGGGGCT GTCAGAAATGT
241 TTCGAGTTTT CCAGCACCGA TCGTCGGGAA CGCACTTCGT CGAGCTGTTC GCTGACGGTC
301 TGCTGTGCTT CATTGCCGCG CTGCTGTCCG CGGCCACGCT GGCCAGTCCG CTGCCCGGCG
361 TCAGTCCGCT GACCCAGATC ATCACGCCGA CCATCCTGCT GGTGCCTTTT TCCTTTGCGC
421 TGGTGATGGC GCTGCTCTAT TCCTTCGTCG GACTCTATCG GCACCGCAAT CTCGGTCTGG
481 TTCCGATGGT CGTGCGCATC GGTTTTTCGT TCCTCGTCGG GGGGTACATC ACTTACCTGA
541 CGCTGAAATA CATCAGCTAT GACGGTTACG CCGGCAGCCT GGTCCGATAT TCGTGGTGT
601 ACCTGCTGGT CGGCCTGATG CTCTACCGGG GCGTGGCGTG GGTGGTCCGC CAGGCCGTGG
661 GCACCCGCGG CGTGTGATC GTCTGGCACC GCCCAGGATG CCGTCAGGTG TGCACCGACC
721 TGCGCGCCGG CGGCCAGTGG GCCGGCTATG ACGTGGTCCG CTTCTACCCG ACCACCGAAC
781 AGACCGACCG GGCTGCGCTG CGTGGTCCG CCCATGTGTT CGACGCCCGC CAGAAAGCTGG
841 TCGATCTGGT GCGCGAGCAC CGCATCAACG AGATCATCGT GCGGGTGC GC GAGCAGCGCG
901 GCGGCGGCGT GCCGATGAAC GATCTGCTCG AGTGCCGCAT CCGCGGCGTG CCGATCATGG
961 ATCTGGCCTA CTTCTACGAG CGCACCAAG CCGAGGTGCC GGTTCGACAG CTGAAGGCCA
1021 GCTGGCTGGT CTATGGCGAC GGCTTCGTCC AGGGCCATGC CCGCGAGCTG ACCAAGCGCC
1081 TGTTTCGACAT CGTCAGCTCC TCGGTGCTGC TGATCCTGGG CCGCGCCGTC ATGCTGATGA
1141 CCGCGCTGAT GATCAAGCTC GACAGTCTCG GCCCGATCCT CTACAGGCAG GAGCGTGTCC
1201 GCCTGGGCGG CAAGGGCTTC ATGTGCATCA AGTTCCGCAG CATGCGCACC GATGCCGAGA
1261 AGGATGGCGT CGTCTGCTGG GCCTCCAAGA ACGACTCGCG CATCACCCGC GTCGGCGCC
1321 TCATCCGCAA GACCCGCATC GACGAGCTGC CGCAGCTCTT CAGCGTGCTG CCGCGCGAGA
1381 TGAGCATGGT GGGCCCGCGT CCGGAGCGCC CGTCTTCGT CGCCAGCTG CCGGAGCAGA
1441 TTCCCTACTA CGACCTGCGC CACACGGTGA AGCCGGGTCT GACCGGCTGG GCCCAGGTCC
1501 GCTATGCCTA CCGCGCCTCG CTCGAGGACG CCCGCAAGAA GCATCAGTTC GACCTGTACT
1561 ACGTCAAGAA CAACTCGCTG CTGCTGGATC TGCAGGTGCT TGCAGAGAC GTGAGCGTGG
1621 TGCTGTTCCG CGAGGGGGCG CACTGAGCAC ATCGAACATG TCGTGCACGC CACAGTCGCC
1681 TGGCCGGGCC TGAAGGCCTG CGGGACGACA GAAGCTCCAG ACCAGAGGAC AGCCGACGGA
1741 ATGCTTTCGT GCGCTGTTCC TGCTTCAAGG CGTGTTCATT TTTATCATT TTTATCATT
1801 C
```

CGC... : Amorces *sthA*

Sens: CGCTGCTCTATTTCCTTCGTC, *lg* : 20 ; *Tm* : 60.12°C ; *Start* : 430

Anti-sens: GCGTAACCGTCATAGCTGA, *lg* : 20 ; *Tm* : 61.19°C ; *Start* : 572

Taille de l'amplicon : 143 paires de bases

ATC... : Amorces Suzuki *et al.*

Sens: ATCGGCACCGCAATCCGGT, *lg* : 20 ; *Tm* : 55.4°C ; *Start* : 457

Anti-sens: ATGCGGGTCTTGC GGATGAA, *lg* : 20 ; *Tm* : 53.8°C ; *Start* : 1320

Taille du produit d'amplification : 863 paires de bases

ATG : codon initiateur

TGA : codon stop

ANNEXE 4

Résultats du Blast pour l'amorce sthA FP

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB050638.1	Sphaerotilus natans gene for putative glycosyltransferase, complete cds	40.1	40.1	100%	0.007	100%
AE007870.2	Agrobacterium tumefaciens str. C58 linear chromosome, complete sequence	32.2	129	100%	1.8	100%
CP000830.1	Dinoroseobacter shibae DFL 12, complete genome	32.2	236	100%	1.8	100%
CP000076.1	Pseudomonas fluorescens Pf-5, complete genome	32.2	82.8	95%	1.8	100%
AE015928.1	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome	32.2	208	90%	1.8	100%
L77732.1	Bacteroides thetaiotaomicron outer membrane protein (susG) gene, complete	32.2	32.2	80%	1.8	100%
AM889285.1	Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 complete genome	30.2	181	100%	7.0	100%
CP000873.1	Brucella canis ATCC 23365 chromosome II, complete sequence	30.2	30.2	95%	7.0	94%
CP000872.1	Brucella canis ATCC 23365 chromosome I, complete sequence	30.2	153	100%	7.0	100%
CP000721.1	Clostridium beijerinckii NCIMB 8052, complete genome	30.2	321	90%	7.0	100%
CP000717.1	Mycobacterium tuberculosis F11, complete genome	30.2	30.2	75%	7.0	100%
CP000611.1	Mycobacterium tuberculosis H37Ra, complete genome	30.2	30.2	75%	7.0	100%
CP000708.1	Brucella ovis ATCC 25840 chromosome I, complete sequence	30.2	153	100%	7.0	100%
CP000709.1	Brucella ovis ATCC 25840 chromosome II, complete sequence	30.2	30.2	95%	7.0	94%
CP000656.1	Mycobacterium gilvum PYR-GCK, complete genome	30.2	30.2	75%	7.0	100%
AM408590.1	Mycobacterium bovis BCG Pasteur 1173P2, complete genome	30.2	30.2	75%	7.0	100%
AM263198.1	Listeria welshimeri serovar 6b str. SLCC5334 complete genome	30.2	78.8	75%	7.0	100%
CP000473.1	Solibacter usitatus Ellin6076, complete genome	30.2	430	100%	7.0	100%
CP000394.1	Granulibacter bethesdensis CGDNIH1, complete genome	30.2	54.5	90%	7.0	100%
CP000446.1	Shewanella sp. MR-4, complete genome	30.2	78.8	80%	7.0	100%
CT573072.1	Kueneria stuttgartiensis genome fragment KUST_D (4 of 5)	30.2	30.2	75%	7.0	100%
CP000127.1	Nitrosococcus oceani ATCC 19707, complete genome	30.2	129	80%	7.0	100%
AE014291.4	Brucella suis 1330 chromosome I, complete sequence	30.2	153	100%	7.0	100%
AE014292.2	Brucella suis 1330 chromosome II, complete sequence	30.2	30.2	95%	7.0	94%
AE000516.2	Mycobacterium tuberculosis CDC1551, complete genome	30.2	30.2	75%	7.0	100%
CP000264.1	Jannaschia sp. CCS1, complete genome	30.2	129	95%	7.0	100%
AE010300.1	Leptospira interrogans serovar lai str. 56601 chromosome I, complete sequer	30.2	129	85%	7.0	100%
BX842580.1	Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome; segment 9/13	30.2	30.2	75%	7.0	100%
BX294147.1	Rhodopirellula baltica SH 1 complete genome; segment 15/24	30.2	30.2	75%	7.0	100%
BX248342.1	Mycobacterium bovis subsp. bovis AF2122/97 complete genome; segment 9/	30.2	30.2	75%	7.0	100%
AF030414.3	Gluconacetobacter diazotrophicus nif gene cluster, complete sequence	30.2	30.2	75%	7.0	100%
AE009529.1	Brucella melitensis 16M chromosome I, section 86 of 195 of the complete sec	30.2	30.2	75%	7.0	100%
AE009693.1	Brucella melitensis 16M chromosome II, section 55 of 107 of the complete se	30.2	30.2	95%	7.0	94%
BA000040.2	Bradyrhizobium japonicum USDA 110 DNA, complete genome	30.2	663	100%	7.0	100%

Résultats du Blast pour l'amorce sthA RP

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB050638.1	Sphaerotilus natans gene for putative glycosyltransferase, complete cds	40.1	40.1	100%	0.007	100%
AE015928.1	Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482, complete genome	34.2	181	100%	0.45	100%
CP000880.1	Salmonella enterica subsp. arizonae serovar 62:z4,z23:---, complete genome	30.2	153	100%	7.0	100%
CP000828.1	Acaryochloris marina MBIC11017, complete genome	30.2	107	100%	7.0	100%
DQ981516.1	Uncultured bacterium done OIP 1A12 putative NADPH-dependent FMN reductase, putativ	30.2	30.2	75%	7.0	100%
CP000802.1	Escherichia coli HS, complete genome	30.2	206	100%	7.0	100%
CP000468.1	Escherichia coli APEC O1, complete genome	30.2	278	100%	7.0	100%
CP000266.1	Shigella flexneri 5 str. 8401, complete genome	30.2	327	100%	7.0	100%
CP000247.1	Escherichia coli 536, complete genome	30.2	230	100%	7.0	100%
CP000270.1	Burkholderia xenovorans LB400 chromosome 1, complete sequence	30.2	78.8	80%	7.0	100%
CP000243.1	Escherichia coli UTI89, complete genome	30.2	254	100%	7.0	100%
AE005674.1	Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome	30.2	303	100%	7.0	100%
AP009048.1	Escherichia coli W3110 DNA, complete genome	30.2	254	100%	7.0	100%
U00096.2	Escherichia coli K12 MG1655, complete genome	30.2	254	100%	7.0	100%
AE014075.1	Escherichia coli CFT073, complete genome	30.2	254	100%	7.0	100%
AE014073.1	Shigella flexneri 2a str. 2457T, complete genome	30.2	278	100%	7.0	100%
U82598.1	Escherichia coli genomic sequence of minutes 9 to 12	30.2	30.2	95%	7.0	94%
BA000007.2	Escherichia coli O157:H7 str. Sakai DNA, complete genome	30.2	303	100%	7.0	100%
CP000155.1	Hahella chejuensis KCTC 2396, complete genome	30.2	323	100%	7.0	100%
AE005174.2	Escherichia coli O157:H7 EDL933, complete genome	30.2	327	100%	7.0	100%
AE008692.1	Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4, complete genome	30.2	133	100%	7.0	100%
CP000034.1	Shigella dysenteriae Sd197, complete genome	30.2	230	100%	7.0	100%
CP000036.1	Shigella boydii Sb227, complete genome	30.2	254	95%	7.0	100%
CP000038.1	Shigella sonnei Ss046, complete genome	30.2	303	100%	7.0	100%
CP000901.1	Yersinia pestis Angola, complete genome	28.2	107	100%	28	100%
CP000891.1	Shewanella baltica OS195, complete genome	28.2	127	90%	28	100%
CP000869.1	Burkholderia multivorans ATCC 17616 chromosome 2, complete sequence	28.2	52.5	100%	28	100%
AE007869.2	Agrobacterium tumefaciens str. C58 circular chromosome, complete sequence	28.2	76.8	70%	28	100%
CP000720.1	Yersinia pseudotuberculosis IP 31758, complete genome	28.2	52.5	75%	28	100%
CP000758.1	Ochrobactrum anthropi ATCC 49188 chromosome 1, complete sequence	28.2	76.8	85%	28	100%
AP009179.1	Sulfurovum sp. NBC37-1 genomic DNA, complete genome	28.2	76.8	90%	28	100%
CP000712.1	Pseudomonas putida F1, complete genome	28.2	202	100%	28	100%
CP000668.1	Yersinia pestis Pestoides F, complete genome	28.2	107	100%	28	100%
AM286415.1	Yersinia enterocolitica subsp. enterocolitica 8081 complete genome	28.2	76.8	85%	28	100%
CP000471.1	Magnetococcus sp. MC-1, complete genome	28.2	153	100%	28	100%
AM167904.1	Bordetella avium 197N complete genome	28.2	101	95%	28	100%
AL590842.1	Yersinia pestis CO92 complete genome	28.2	107	100%	28	100%
CP000158.1	Hyphomonas neptunium ATCC 15444, complete genome	28.2	155	100%	28	100%

ANNEXE 5

Positionnement des deux couples d'amorces initialement utilisés pour le séquençage du gène *sthA* des différentes souches de *S. natans*.

```
1 GAAGACACAC GCTGATTTGT ACGCATCTGT TGACGCAGTT GGTACAAGTC TTCACTCTCA
61 CGTCAATACG TCACACAATC GTGCTCCAGT CTCCCCTGCT TGGGGGAATG AGGGTGCCCG
121 TGCATCAGGC GCCAGGGAGT CAGGGTCTGAA AATCAGGGGG TCAGCAATGA TGGCCTCCAG
181 TCCTGCGCAA GTGACGCGAG ACGCATTGCC AGTGTTTTGC CAAGGGGGCT GTCAGAAATGT
241 TTCGAGTTTT CCAGCACCGA TCGTCGGGAA CGCACTTCGT CGAGCTGTTC GCTGACGGTC
301 TGCTGTGCTT CATTGCCGCG CTGCTGTCCG CGGCCACGCT GGCCAGTCCG CTGCCCGGCG
361 TCAGTCCGCT GACCCAGATC ATCACGCCGA CCATCCTGCT GGTGCGCTTT TCCTTTGCGC
421 TGGTGTATGG GCTGCTCTAT TCCTTCGTCG GACTCTATCG GCACCGCAAT CTCGGTCTGG
481 TTCCGATGGT CGTGCGCATC GGTTTTGCCT TCCTCGTCGG GGGGTACATC ACTTACCTGA
541 CGTGAATAA CATCAGCTAT GACGGTTACG CCGGCAGCCT GGTCCGATAT TCGCTGGTGT
601 ACCTGCTGGT CGGCCTGATG CTCTACCGGG CCGTGGCGTG GGTGGTCCGC CAGGCCGTGG
661 GCACCCGCGG CGTGTGATC GTCGGCACCG GCCCGGATGC CCGTCAGGTG TGCACCGACC
721 TGCGCGCCGG CGGCCAGTGG GCCGGCTATG ACGTGGTCCG CTTCTACCCG ACCACCGAAC
781 AGACCGACCG GGCTGCGCTG CGTGGTCCG CCCATGTGTT CGACGCCCGC CAGAAGCTGG
841 TCGATCTGGT GCGCGAGCAC CGCATCAACG AGATCATCGT GCGGGTGC GC GAGCAGCGCG
901 GCGGCGGCGT GCCGATGAAC GATCTGCTCG AGTGCCGCAT CCGCGGCGTG CCGATCATGG
961 ATCTGGCCTA CTTCTACGAG CGCACCAAGG CCGAGGTGCC GGTGACAGC CTGAAGGCCA
1021 GCTGGCTGGT CTATGGCGAC GGCTTCGTCC AGGGCCATGC CCGCGAGCTG ACCAAGCGCC
1081 TGTTTCGACAT CGTCAGCTCC TCGGTGCTGC TGATCCTGGG CCGCGCCGTC ATGCTGATGA
1141 CCGCGCTGAT GATCAAGCTC GACAGTCTCG GCCCGATCCT CTACAGGCAG GAGCGTGTCC
1201 GCCTGGGCGG CAAGGGCTTC ATGTGCATCA AGTTCCGCAG CATGCGCACC GATGCCGAGA
1261 AGGATGGCGT CGCTCGCTGG GCCTCCAAGA ACGACTCGCG CATCACCCGC GTCGGCGCCT
1321 TCATCCGCAA GACCCGCATC GACGAGCTGC CGCAGCTCTT CAGCGTGTCTG CGCGGCGAGA
1381 TGAGCATGGT GGGCCCGCGT CCGGAGCGCC CGTCTTCGT CGCCAGCTG CGCGAGCAGA
1441 TTCCCTACTA CGACCTGCGC CACACGGTGA AGCCGGGTCT GACCGGCTGG GCCCAGGTCC
1501 GCTATCCCTA CGGCGCCTCG CTCGAGGACG CCCGCAAGAA GCATCAGTT GACCTGTACT
1561 ACGTCAAGAA CAACTCGCTG CTGCTGGATC TGCAGGTGCT GATCGAGACG GTGAGCGTGG
1621 TGCTGTTCCG CGAGGGGGCG CACTGAGCAC ATCGAACATG TCGTGCACGC CACAGTCGCC
1681 TGGCCGGGCC TGAAGGCCTG CGGGACGACA GAAGCTCCAG ACCAGAGGAC AGCGCACGGA
1741 ATGCTTTCGT GCGCTGTTCC TGCTTCAAGG CGTGTTTCATT TTTATCATTT TCATGATCTG
1801 C
```

ACA... : Amorces *sthA* L1 :

- **FP** : ACACACGCTGATTTGTACGC, **lg** : 20 pb ; **Tm** : 58,5 C ; **Start** : 5
 - **RP** : TGTCCTCTGGTCTGGAGCTT, **lg** : 20 pb ; **Tm** : 59,4°C ; **Start** : 1711
- Taille de l'amplicon** : 1726 paires de bases

ATC... Amorces *sthA* L2 :

- **FP** : ATCGGCACCGCAATCCGGT, **lg** : 20 pb ; **Tm** : 58,4°C ; **Start** : 136
 - **RP** : ATGCGGGTCTTGCGGATGAA, **lg** : 20 pb ; **Tm** : 61,4°C ; **Start** : 1693
- Taille du produit d'amplification** : 1587 paires de bases

AAG... : Séquence commune aux amorces *sthA* L1 RP et *sthA* L2 RP.

ANNEXE 6

Positionnements des différents couples d'amorces utilisés pour le séquençage du gène *sthA*

```
1 GAAGACACAC GCTGATTTGT ACGCATCTGT TGACGCAGTT GGTACAAGTC TTCACTCTCA
61 CGTCAATACG TCACACAATC GTGCTCCAGT CTCCCCTGCT TGGGGGAATG AGGGTGCCCG
121 TGCATCAGGC GCCAGGGAGT CAGGGTCGAA AATCAGGGGG TCAGCAATGA TGGCCTCCAG
181 TCCTGCGCAA GTGACGCGAG ACGCATTGCC AGTGTTTTGC CAAGGGGGCT GTCAGAAATGT
241 TTCGAGTTTT CCAGCACCGA TCGTCGGGAA CGCACTTCGT CGAGCTGTTC GCTGACGGTC
301 TGCTGTGCTT CATTGCCGCG CTGCTGTTCG CGGCCACGCT GGCCAGTCCG CTGCCCGGCG
361 TCAGTCCGCT GACCCAGATC ATCACGCCGA CCATCCTGCT GGTGCGCTTT TCCTTTGCGC
421 TGGTGATGGC GCTGCTCTAT TCCTTCGTCG GACTCTATCG GCACCGCAAT CTCGGTCTGG
481 TTCCGATGGT CGTGCGCATC GGTTTTGCGT TCCTCGTCGG GGGGTACATC ACTTACCTGA
541 CGCTGAAATA CATCAGCTAT GACGGTTACG CCGGCAGCCT GGTGCGATAT TCGCTGGTGT
601 ACCTGCTGGT CGGCCTGATG CTCTACCGGG GCGTGGCGTG GGTGGTCCGC CAGGCCGTGG
661 GCACCCGCCG CGTGTGATC GTCGGCACCG GCCCGGATGC CCGTCAGGTG TGCACCGACC
721 TGCGCGCCGG CGGCCAGTGG GCCGGCTATG ACGTGGTCGG CTCTACCCG ACCACCGAAC
781 AGACCGACCG GGCTGCGCTG CGTGGTGCCG CCCATGTGTT CGACGCCCGC CAGAAGCTGG
841 TCGATCTGGT GCGCGAGCAC CGCATCAACG AGATCATCGT GCGGGTGCGC GAGCAGCGCG
901 GCGGCGGCGT GCCGATGAAC GATCTGCTCG AGTGCCGCAT CCGCGGCGTG CCGATCATGG
961 ATCTGGCCTA CTTCTACGAG CGCACC AAGG CCGAGGTGCC GGTGACAGC CTGAAGGCCA
1021 GCTGGCTGGT CTATGGCGAC GGCTTCGTCC AGGGCCATGC CCGCGAGCTG ACCAAGCGCC
1081 TGTTTCGACAT CGTCAGCTCC TCGGTGCTGC TGATCCTGGG CGCGCCGGTC ATGCTGATGA
1141 CCGCGCTGAT GATCAAGCTC GACAGTCTCG GCCCGATCCT CTACAGGCAG GAGCGTGTG
1201 GCCTGGGCGG CAAGGGCTTC ATGTGCATCA AGTTCCGCG CATGCGCACC GATGCCGAGA
1261 AGGATGGCGT CGCTCGCTGG GCCTCCAAGA ACGACTCGCG CATCACCCGC GTCGGCGCCT
1321 TCATCCGCAA GACCCGCATC GACGAGCTGC CGCAGCTCTT CAGCGTGCTG CGCGGCGAGA
1381 TGAGCATGGT GGGCCCGCGT CCGGAGCGCC CGTCTTCGT CGCCAGCTG CGCGAGCAGA
1441 TTCCCTACTA CGACCTGCGC CACACGGTGA AGCCGGGTCT GACCGGCTGG GCCAGGTCC
1501 GCTATGCCTA CGGCGCCTCG CTCGAGGACG CCCGCAAGAA GCATCAGTTC GACCTGTACT
1561 ACGTCAAGAA CAACTCGCTG CTGCTGGATC TGCAGGTGCT GATCGAGACG GTGAGCGTGG
1621 TGCTGTTCCG CGAGGGGGCG CACTGAGCAC ATCGAACATG TCGTGCACGC CACAGTCGCC
1681 TGGCCGGGCC TGAAGGCCTG CGGGACGACA GAAGTCCAG ACCAGAGGAC AGCGCACGGA
1741 ATGCTTTCGT GCGCTGTTG TGCTTCAAGG CGTGTTCATT TTATATCATT TCATGATCTG
1801 C
```

CAT... : couple *sthA* L FP 24/*sthA* RP

Taille du produit d'amplification : 548 paires de bases

CGC... : couple *sthA* FP/*sthA* L RP 986

Taille du produit d'amplification : 556 paires de bases

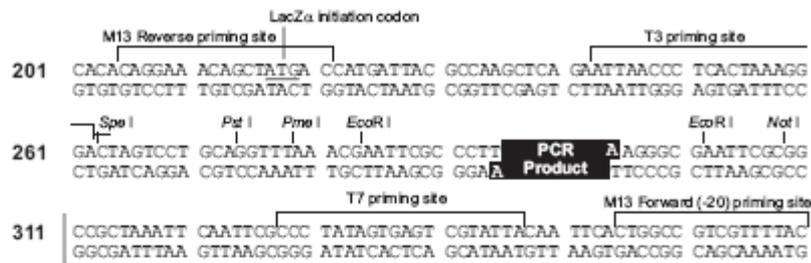
AGA... : couple *sthA* L FP 832/*sthA* L RP 1781

Taille du produit d'amplification : 949 paires de bases

ANNEXE 7

Carte de plasmide utilisé pour le clonage du gène *sthA*.

pCR[®]4-TOPO[®] Map The map below shows the features of pCR[®]4-TOPO[®] and the sequence surrounding the TOPO[®] Cloning site. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The complete sequence of pCR[®]4-TOPO[®] is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (page 27).



Comments for pCR[®]4-TOPO[®]
3956 nucleotides

- lac* promoter region: bases 2-216
 - CAP binding site: bases 95-132
 - RNA polymerase binding site: bases 133-178
 - Lac repressor binding site: bases 179-199
 - Start of transcription: base 179
 - M13 Reverse priming site: bases 205-221
 - LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
 - LacZα portion of fusion: bases 217-497
 - ccdB* portion of fusion: bases 508-810
 - T3 priming site: bases 243-262
 - TOPO[®] Cloning site: bases 294-295
 - T7 priming site: bases 328-347
 - M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
 - Kanamycin promoter: bases 1021-1070
 - Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
 - Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
 - Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3064-3160 (c)
 - pUC origin: bases 3161-3834
- (c) = complementary strand

Issue du protocole fourni avec le kit TOPO-TA cloning kit for sequencing (Invitrogen-Molecular Probes)

ANNEXE 8

Analyses de la spécificité des couples d'amorces 16S sna 1 et 2 pour la bactérie *Sphaerotilus natans* par BLAST.

■ Amorces 16S sna 1 FP :

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU143672.1	Uncultured <i>Sphaerotilus</i> sp. clone DS-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
Z18534.1	<i>S. natans</i> 16S ribosomal DNA	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AP007295.1	<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1 DNA, complete genome	36.2	60.5	90%	0.11	100%	
CP000759.1	<i>Chrobactrum anthropi</i> ATCC 49188 chromosome 1, complete sequence	32.2	179	90%	1.8	100%	
CP000408.1	<i>Streptococcus suis</i> 98HAH33, complete genome	32.2	105	100%	1.8	100%	
CP000407.1	<i>Streptococcus suis</i> 052YH33, complete genome	32.2	105	100%	1.8	100%	
CP000387.1	<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36, complete genome	32.2	32.2	80%	1.8	100%	
AM746676.1	<i>Sorangium cellulosum</i> 'So ce 56' complete genome	30.2	772	100%	7.0	100%	
AE007869.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> str. C58 circular chromosome, complete sequence	30.2	105	90%	7.0	100%	
CP000774.1	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1, complete genome	30.2	258	95%	7.0	100%	
CP000769.1	<i>Anaeromyxobacter</i> str. Fv109-5, complete genome	30.2	467	85%	7.0	100%	
CP000325.1	<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99, complete genome	30.2	299	90%	7.0	100%	
CP000480.1	<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155, complete genome	30.2	851	100%	7.0	100%	
CP000458.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> HI2424 chromosome 1, complete sequence	30.2	853	100%	7.0	100%	
CP000378.1	<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054 chromosome 1, complete sequence	30.2	754	100%	7.0	100%	
CP000270.1	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 chromosome 1, complete sequence	30.2	606	100%	7.0	100%	
AF283003.1	<i>Vibrio angustum</i> RNA polymerase sigma E (rhoE), putative inner membrane protei	30.2	30.2	75%	7.0	100%	
AE016877.1	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579, complete genome	30.2	30.2	75%	7.0	100%	
AL591975.1	<i>Listeria monocytogenes</i> strain EGD, complete genome, segment 3/12	30.2	80.8	85%	7.0	100%	
AE017262.2	<i>Listeria monocytogenes</i> str. 4b F2365, complete genome	30.2	177	100%	7.0	100%	
AM902716.1	<i>Bordetella pertussis</i> strain DSM 12804, complete genome	28.2	307	100%	28	100%	
CP000901.1	<i>Yersinia pestis</i> Angola, complete genome	28.2	101	90%	28	100%	
CP000900.1	<i>Yersinia pestis</i> Angola plasmid pMT-pPCP, complete sequence	28.2	28.2	70%	28	100%	
CP000869.1	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616 chromosome 2, complete sequence	28.2	394	100%	28	100%	
CP000957.2	<i>Haemophilus influenzae</i> 86-028NP, complete genome	28.2	28.2	70%	28	100%	
CP000720.1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 31758, complete genome	28.2	101	90%	28	100%	
CP000746.1	<i>Actinobacillus succinogenes</i> 1302, complete genome	28.2	52.5	75%	28	100%	
CP000723.1	<i>Yersinia pestis</i> CA89-4125 plasmid pMT1, complete sequence	28.2	28.2	70%	28	100%	
CP000672.1	<i>Haemophilus influenzae</i> PittGG, complete genome	28.2	28.2	70%	28	100%	
CP000671.1	<i>Haemophilus influenzae</i> PittEE, complete genome	28.2	52.5	85%	28	100%	
CP000699.1	<i>Sphingomonas wittichii</i> RW1, complete genome	28.2	149	90%	28	100%	
CP000698.1	<i>Geobacter uranireducens</i> RF4, complete genome	28.2	52.5	90%	28	100%	
CP000304.1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501, complete genome	28.2	222	100%	28	100%	
CP000670.1	<i>Yersinia pestis</i> Pestoides F plasmid MT, complete sequence	28.2	28.2	70%	28	100%	
CP000668.1	<i>Yersinia pestis</i> Pestoides F, complete genome	28.2	101	90%	28	100%	
CU207211.1	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i> chromosome, complete sequence	28.2	125	90%	28	100%	
CP000580.1	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS, complete genome	28.2	665	90%	28	100%	
DQ973530.1	<i>Vibrio vulnificus</i> biotype 2 ferric vulnibactin outer membrane receptor (vuuaA) gene,	28.2	28.2	70%	28	100%	
DQ973529.1	<i>Vibrio vulnificus</i> biotype 3 ferric vulnibactin outer membrane receptor (vuuaA) gene,	28.2	28.2	70%	28	100%	
DQ980539.1	<i>Vibrio vulnificus</i> strain SPRC 10213 ferric vulnibactin outer membrane receptor (vu	28.2	28.2	70%	28	100%	

■ Amorces 16S sna 1 RP :

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU304771.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain M3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU287397.1	Uncultured bacterium clone S26-97 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU287393.1	Uncultured bacterium clone S26-93 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU287346.1	Uncultured bacterium clone S26-46 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU287142.1	Uncultured bacterium clone P13-49 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU287108.1	Uncultured bacterium clone P13-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM910871.1	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> partial 16S rRNA gene, strain REI_24	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM910870.1	<i>Aeromonas</i> sp. REI_107 partial 16S rRNA gene, strain REI_107	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM910869.1	<i>Aeromonas</i> sp. REI_59 partial 16S rRNA gene, strain REI_59	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU249560.1	Uncultured <i>Aeromonas</i> sp. clone PmeaMucA9 16S ribosomal RNA gene, parti	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU254233.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain ATCC 7966 16S ribosomal RNA gene, partial se	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU254227.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SW010 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU254226.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SW016 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU254225.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SW007 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU254223.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain SW012 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM905315.1	Uncultured gamma proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone SR-O-03-3:	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU220874.1	Uncultured bacterium clone FRUp_3_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU220868.1	Uncultured bacterium clone FRUp_2_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EF451615.1	Uncultured bacterium clone ARDRA0608 16S ribosomal RNA gene, partial seq	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU200973.1	<i>Aeromonas</i> sp. SAWW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU182896.1	<i>Aeromonas</i> sp. MH07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU136209.1	Uncultured Enterobacteriales bacterium isolate mid11 16S ribosomal RNA ger	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU136205.1	Uncultured Aeromonadales bacterium isolate mid07 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU136201.1	Uncultured Aeromonadales bacterium isolate mid03 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU136199.1	Uncultured Aeromonadales bacterium isolate mid01 16S ribosomal RNA gene	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU136193.1	Uncultured Aeromonadales bacterium isolate hin03 16S ribosomal RNA gene,	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EU136192.1	Uncultured Aeromonadales bacterium isolate hin02 16S ribosomal RNA gene,	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
DQ676385.1	Uncultured gamma proteobacterium clone MVP-79 16S ribosomal RNA gene,	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM710207.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate Drobiligo_Isolate360	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM710173.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate Drobiligo_Isolate311	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM710171.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate Drobiligo_Isolate307	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM710169.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate Drobiligo_Isolate305	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM710093.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate Drobiligo_Isolate185	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
AM710081.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, isolate Drobiligo_Isolate173	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EF440371.1	Uncultured soil bacterium clone 17C_MJK 16S ribosomal RNA gene, partial se	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EF465529.1	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> strain CECT 4487 16S ribosomal RNA gene, par	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
DQ520910.1	Aeromonadaceae bacterium NR113 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EF516037.1	Uncultured bacterium clone FCPP735 16S ribosomal RNA gene, complete seq	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EF515448.1	Uncultured bacterium clone 24e08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.007	100%	
EF515445.1	Uncultured bacterium clone 24e03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	40.1	40.1	100%	0.007	100%	

■ Amorces 16S sna 2 FP :

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY038766.1	Uncultured CF8 group bacterium clone TAF-A198 16S ribosomal RNA gene, part	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AY315237.1	Uncultured rumen bacterium done JRCH14 16S ribosomal RNA gene, partial se	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AJ431346.1	Uncultured planctomycete partial 16S rRNA gene, isolate iKaite un-c19	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
Z18534.1	S.natans 16S ribosomal DNA	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
EU044173.1	Uncultured bacterium done GASP-38KC-538-B04 16S ribosomal RNA gene, part	48.1	48.1	96%	8e-05	100%	
DQ374179.1	Uncultured bacterium done Souza16535 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	44.1	44.1	88%	0.001	100%	
X77847.1	Clostridium filamentosum 16S rRNA gene, strain DSM 6645	44.1	44.1	100%	0.001	96%	
EU268118.1	Uncultured bacterium done ZL1708 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU268117.1	Uncultured bacterium done ZL1707 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU268105.1	Uncultured bacterium done L0811 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU268102.1	Uncultured bacterium done L4808 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU268092.1	Uncultured bacterium done L3450 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU268091.1	Uncultured bacterium done L3145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU268079.1	Uncultured bacterium done L1335 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EU043984.1	Uncultured alpha proteobacterium done GASP-16KB-371-C11 16S ribosomal RN	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EF575341.1	Uncultured bacterium done 625_1685 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
AB202193.2	Bacterium 072814 gene for 16S rRNA, complete sequence, strain: 072814	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EF52274.1	Uncultured Chloroflexi bacterium done OCLS012 16S ribosomal RNA gene, part	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
AB294995.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: pitb-RF-25	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
EF014702.1	Uncultured bacterium done Cb303s.12 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
DQ911767.1	Uncultured Bacteroidetes bacterium isolate DGGE band GB02-e11-F1 16S ribos	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
DQ889913.1	Uncultured alpha proteobacterium done EC75 16S ribosomal RNA gene, partial	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
DQ659620.1	Bacillus sp. itrcnbs3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
DQ330669.1	Uncultured candidate division OP10 bacterium done 04GH220 16S ribosomal R	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
DQ330651.1	Uncultured candidate division OP10 bacterium done 02GH121 16S ribosomal R	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
DQ235027.1	Uncultured bacterium done ML-5-117 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
AF364908.1	Uncultured bacterium done dB70 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
U85100.1	Unidentified cytophagales done ACK-C70 16S ribosomal RNA gene, partial seq	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
U87827.1	Unidentified eubacterium v2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
AF477798.1	Uncultured beta proteobacterium done AGCM15 16S ribosomal RNA gene, parti	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
AB196095.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:TB003-83	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
AY907819.1	Uncultured bacterium done A714008 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
AY550829.1	Uncultured bacterium done PEL_93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
AY550780.1	Uncultured bacterium done BN_15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	84%	0.005	100%	
X93477.1	Phototrophic bacterium 16S rRNA gene (DSM 2110)	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
Y13857.1	Nesterenkonia halobia 16S ribosomal RNA	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
AJ001222.1	Uncultured bacterium DA154 16S ribosomal RNA	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
U87822.1	Corynebacterium pseudogenitalium 16S ribosomal RNA gene, complete sequer	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
U87815.1	Corynebacterium jeikeium 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
U87824.1	Corynebacterium genitalium 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	

■ Amorce 16S sna 2 RP :

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

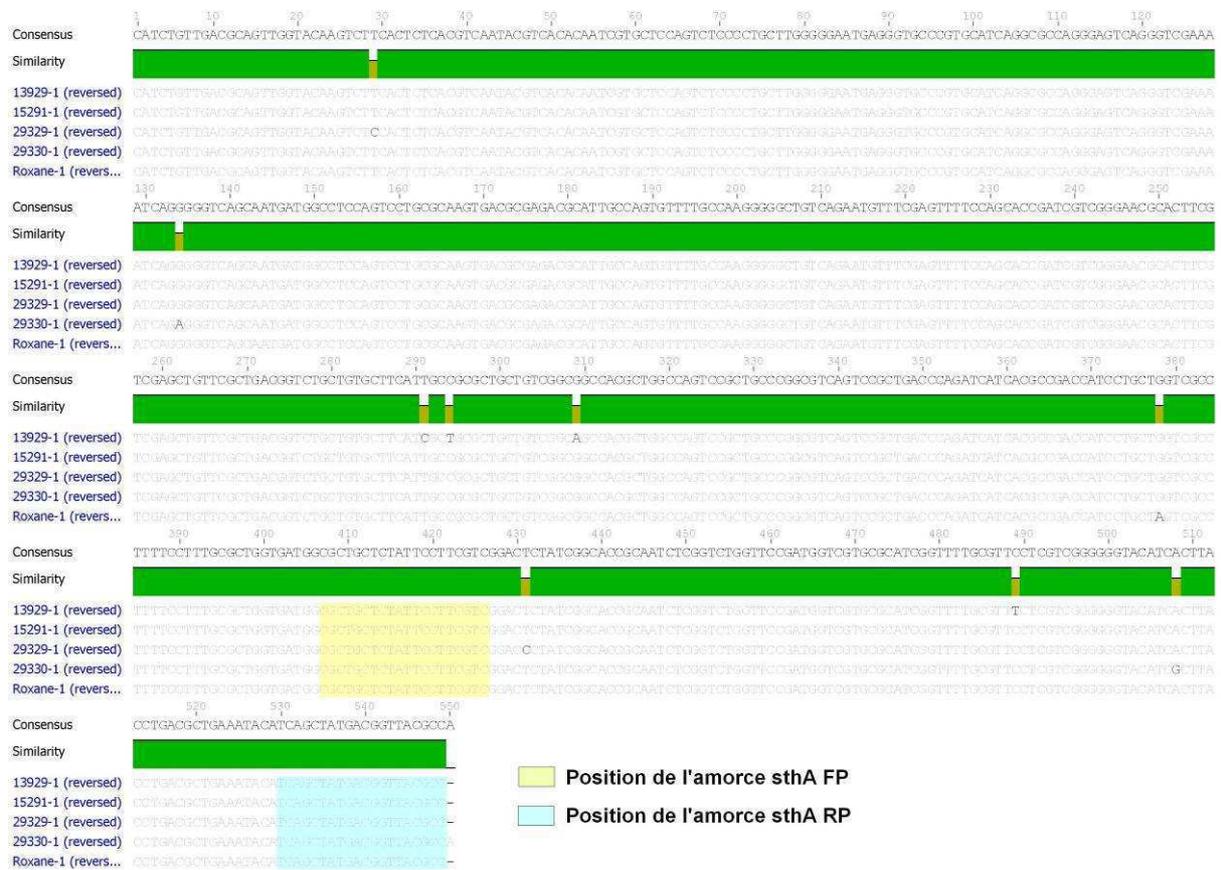
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Link
EF520457.1	Uncultured beta proteobacterium done ADK-GR02-95 16S ribosomal RNA ge	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
EF470956.1	Uncultured bacterium done 61-10R 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
EF095039.1	Uncultured bacterium done BFS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AY212687.1	Uncultured bacterium done 23ds5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AB199573.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:RVW-06	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AB075147.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:TCR814	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AB075119.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:KSR6	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AY809227.1	Uncultured bacterium done D68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AY809216.1	Uncultured bacterium done C6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AJ422177.2	uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, done Spb300	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AJ421915.2	Uncultured beta proteobacterium partial 16S rRNA gene, done Elb37	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
Z18534.1	S.natans 16S ribosomal DNA	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
AB072236.1	Sphaerotilus natans gene for 16S rRNA, partial sequence	50.1	50.1	100%	2e-05	100%	
EU267444.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-80Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267442.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-64Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267440.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-58Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267439.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-52Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267436.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-03Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267434.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-01Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267428.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rs-84Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267427.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rs-81Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267423.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rs-61Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267417.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-92Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU267414.1	Uncultured bacterium done IIIIEA1-rp-62Nit 16S ribosomal RNA gene, partial :	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU220897.1	Uncultured bacterium done GB127_3_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU220861.1	Uncultured bacterium done FRDn_4_1 16S ribosomal RNA gene, partial sequ	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU224353.1	Uncultured bacterium done 4R-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU224348.1	Uncultured bacterium done 9D-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU180552.1	Beta proteobacterium BAC320P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence:	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU180546.1	Beta proteobacterium BAC174P 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU180537.1	Beta proteobacterium BAC126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU180509.1	Alpha proteobacterium BAC29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU180508.1	Alpha proteobacterium BAC11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU078227.1	Uncultured freshwater bacterium done DL2-27 16S ribosomal RNA gene, parti	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU078224.1	Uncultured freshwater bacterium done DL2-11 16S ribosomal RNA gene, parti	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU030493.1	Uncultured bacterium done KIS.T79 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU030491.1	Uncultured bacterium done KIS.T28 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EU030484.1	Uncultured bacterium done KIS.B26 16S ribosomal RNA gene, partial sequen	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EF999032.1	Uncultured Acidobacteria bacterium done M27 16S ribosomal RNA gene, parti	42.1	42.1	100%	0.005	96%	
EF653578.1	Uncultured bacterium done DTH8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	42.1	42.1	100%	0.005	96%	

ANNEXE 9

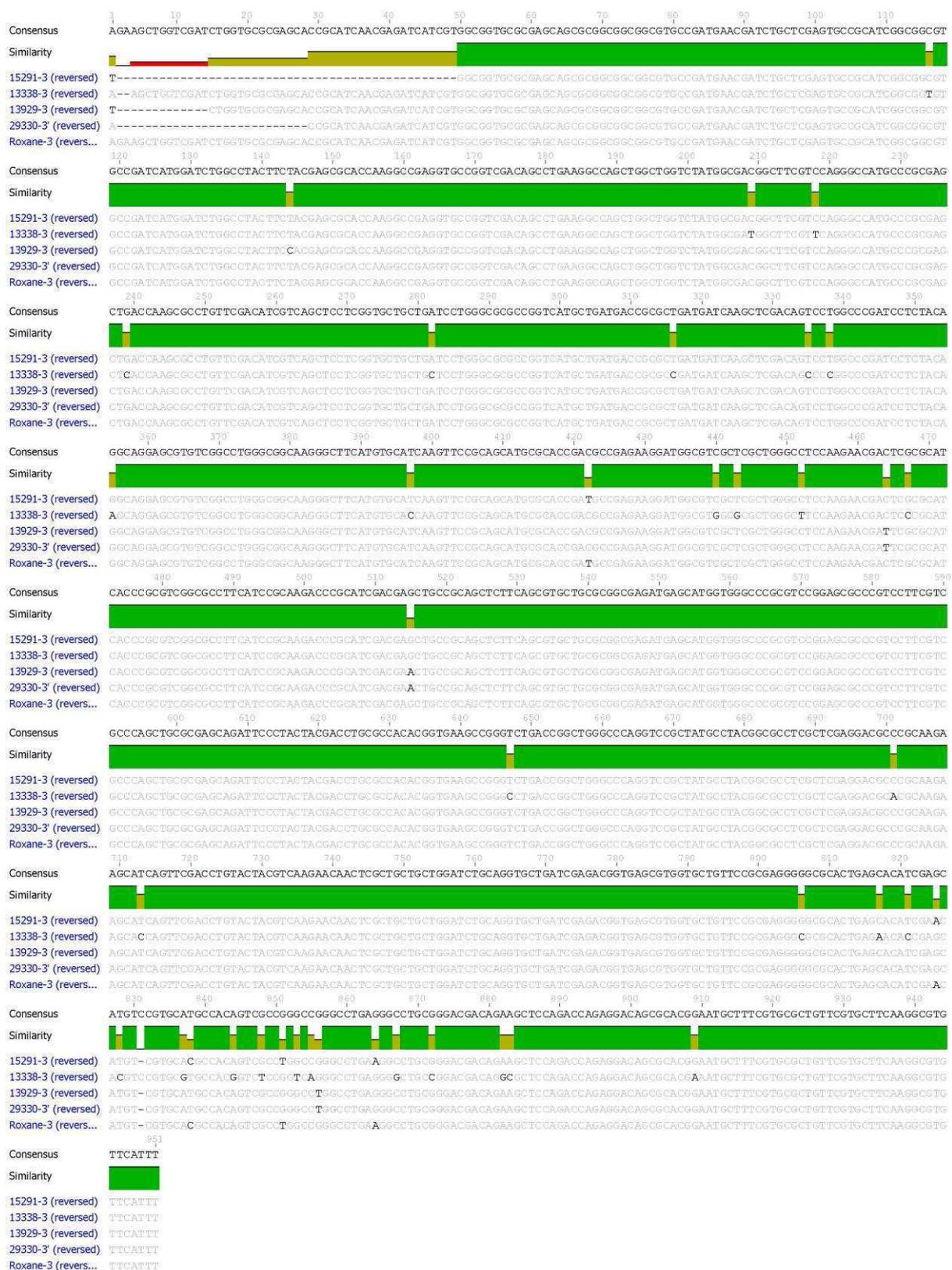
Alignements des séquences totales et partielles du gène *sthA* pour les différentes souches de *Sphaerotilus natans* étudiées.



A - Alignements des séquences complètes du gène *sthA* pour les souches *S. natans* 15291, 13338T et 13929.



B - Alignements des séquences du gène *sthA* obtenues grâce à l'amplification par le couple d'amorces sthA L FP 24/sthA RP pour les 6 souches de *S. natans*.



C - Alignements des séquences du gène *sthA* obtenues grâce à l'amplification par le couple d'amorces *sthA* L FP 832/*sthA* L 1781 RP pour 5 des souches de *S. natans*.

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90
 GAAGACACACGCTGATTTGTACGCATCTGTTGACGCAGTTGGTACAAAGTCTTCACTCTCACGTCAATACGTACACAAATCGTGCTCCAGTCTCCCC
 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190
 TGCTTGGGGGAATGAGGGTGCCCGTGCATCAGGCGCCAGGGAGTCAGGGTCGAAAATCAGGGGGTCAGCAATGATGGCCGCCAGTCTGCCAAGT
 200 210 220 230 240 250 260 270 280
 GACGCGAGACGCATTGCCAGTGTTCGCAAGGGGGCTGTTCAGAATGTTTCGAGTTCAGCAGCAGGATCGTCGGGAACGCCTTCGTCGAGCTGT
 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380
 TCGCTGACGGTCTGCTGTGCTTCATTGCCGCGCTGCTGTGCGCAGCCACGCTGGCCAGTCCGCTGCCCGCGCTCAGTCCGCTGACCCAGATCATCA
 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
 CGCCGACCATCCTGCTGGTCGCCTTTTCCCTTTGCGCTGGTGATGGCGCTGCTCTATTCCCTTCGTCGGACTCTATCGGCACCGCAATCTCGGTCTGG
 490 500 510 520 530 540 550 560 570
 TTCGATGTCGTCGCGCATCGGTTTTGCGTTCCTCGTCGCGGGGTACATCACCTTACCTGACGCTGAAATACATCAGCTATGACGGTTATGCCGGCA
 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670
 GCCTGGTCGGATATTCGCTGGTGTACCTGCTGGTCCGCCGTGATGCTCTACCGGGCGTGGCGTGGTGGTCCGCCAGGCCGTTGGGACCCGCCCGG
 680 690 700 710 720 730 740 750 760
 TGCTGATCGTCGCGACCGCCCGGATGCCGTCAGGTGTGCACCGACCTGCGCGCCGGCGGCCAGTGGGCGGCTATGACGTTGGTCCGCTTCTTACC
 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
 CGACCACCGAACAGACCACCGCCCGCGCTGCGTGGTCCGCCCATGTGTTTCGACGCCCGCCAGAAGCTGGTGCATCTGGTCCGCGAGCACCGCA
 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960
 TCAACGAGATCATCGTGGCGGTGCGCGAGCAGCGCGCGCGCGCTGCCGATGAACGATCTGCTCGAGTCCCGCATCGGGCGGCTGCCGATCATGG
 970 980 990 1,000 1,010 1,020 1,030 1,040 1,050
 ATCTGECCTACTTCTACGAGCGCACCAAGGCCGAGGTGCCGGTTCGACAGCCTGAAGGCCAGCTGGCTGGTCTATGGGACGGCTTCGTCAGGGCC
 1,060 1,070 1,080 1,090 1,100 1,110 1,120 1,130 1,140 1,150
 ATGCCCGGAGCTGACCAAGCGCCTGTTCGACATCGTCAAGCTCCCGGTGCTGCTGATCCTGGGCGCGCGTGCATGCTGATGACCGCGCTGATGA
 1,160 1,170 1,180 1,190 1,200 1,210 1,220 1,230 1,240
 TCAAGCTCGACAGTCTTGGCCGATCCTCTACAGGAGGAGCGTGTCCGCTGGGCGGCAGGGCTTCAATGTCATCAAGTTCGCGAGCATGCGCA
 1,250 1,260 1,270 1,280 1,290 1,300 1,310 1,320 1,330 1,340
 CCGACCGCGAAGAGGATGGCTGCTGCTGGCCCTCCAGAAGCACTCGCGCATCACCGCGTCCGGCGCTTCATCCGCAAGACCCGCATCGACG
 1,350 1,360 1,370 1,380 1,390 1,400 1,410 1,420 1,430 1,440
 AGCTGCCGCAAGCTCTTACAGGTGCTGCGCGCGGAGATGAGCATGGTGGGCCCCGGTCCGGAGCGCCCGTCCCTTCGTCGCCAGCTGCGCGAGCAGA
 1,450 1,460 1,470 1,480 1,490 1,500 1,510 1,520 1,530
 TTCCTACTACGACCTGCGCCACACGGTGAAGCCGGTGTGACCGGCTGGGCCAGGTCCGCTATGCTACGGCGCCTCGCTCGAGGACGCCCGCA
 1,540 1,550 1,560 1,570 1,580 1,590 1,600 1,610 1,620 1,630
 AGAAGCATCAAGTTCGACCTGTACTACGTCAAGAACAACCTCGCTGCTGCTGGATCTGCAGGTGCTGATCGAGACGGTGGGCGTGGTGTTCGCGG
 1,640 1,650 1,660 1,670 1,680 1,690 1,700 1,710 1,720
 AGGGGGCGCACTGAGCACATCGAGCATGTCGTCGATGCCACAGTGCCTGGGCGGGCTGAGGGCCGCGGGACGACAGAAGCTCCAGACCAGAG
 1,730 1,740 1,750 1,760 1,770 1,780 1,790 1,800
 GACAGCGCACGGAATGCTTTCGTCGCTGTTCGTCGCTTCAAGCGGTGTTTATTTTATCATTTTTCATGATCTGC

D – Séquence consensus du gène *sthA* définie sur la base des différentes séquences obtenues pour chacune des souches de *S. natans*.

ANNEXE 10

Protocole d'extraction de la gaine de *Sphaerotilus natans*.

Préparation de l'inoculum :

100 µl d'une culture de bactéries sont à incubées à 30°C pendant 2 jours dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 100ml du milieu de culture suivant :

- 0,6% de glucose
- 0,3% de Protéose-Peptide N°3 (Gifco)
- 0,02% d'extrait de levure
- 0,02% de MgSO₄

Préparation des bactéries pour extraction de la gaine :

200 µl de l'inoculum sont mis à incuber à 30°C pendant 48h et sous agitation dans une flasque de 2,5 L contenant 750 ml du milieu suivant :

- 0,2% de Protéose-Peptide N°3
- 0,02% d'extrait de levure
- 0,02% de MgSO₄

Extraction de la gaine :

- Collecter les cellules de 2 à 3 L de culture par centrifugation.
- Laver le culot à l'eau distillée et le resuspendre avec 90 ml de tampon Tris-HCl à 30 mM (pH 8.0) contenant à 0,5 g/l d'EDTA.
- Ajouter 20 mg de lysozyme et incuber 1 à 3h à 37°C.
- Ajouter 10 ml de SDS 10% et incuber à 60°C pendant 3 heures. Pendant ce temps plonger à plusieurs reprises le mélange dans un bac de glace pendant 5 minutes et le remettre aussitôt à 60°C afin de produire des chocs thermiques.

Un voile semi-translucide correspondant à la gaine partiellement purifiée apparaît alors.

- Recueillir la gaine, la laver avec de l'eau distillée et la reprendre dans 45 ml de Tris-EDTA contenant 10 mg de protéase type XIV (Sigma).
- Incubation 3h à 37°C.
- Ajouter 5 ml de SDS 10% et incuber à 60°C pendant une nuit.
- Laver les gaines purifiées à l'eau distillée.

ANNEXE 11

Protéines identifiées chez *S. natans* 15291 sous forme dispersé

Accession	Score (%)	Coverage(%)	Description	Peptide	Score(%)
gi 47573980	99	26,11%	F0F1-type ATP synthase, beta subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]	TIALGSSDGLR	64,37455
				YVPLKETIR	39,16051
				TIALGSSDGLRR	68,26005
				AHSGLSVFAGVGER	53,07647
				VAMVYQGMNEPPGNR	64,38646
				VALTGLTIAESFR	81,77038
				AHSGLSVFAGVGER	99
				MPSAVGYQPTLAE(E(MoxM)GR	95,97948
				FLSQPFHVAEVFTGSPGK	99
				YTLAGTEVSALLGR	99
				MPSAVGYQPTLAEEMGR	85,18634
				MPSAVGYQPTLAEEMGR	99
				KAPAYDELSPSQELLELETGIK	99
				KAPAYDELSPSQELLELETGIK	99
				APAYDELSPSQELLELETGIK	99
				gi 56477591	99
NIGISAHIDAGK	93,90147				
MGIALGR	62,24189				
NIGISAHIDAGK	99				
IGEVHDGAATMDWMEQEQR	44,66668				
FNIIDTPGHVDFTIEVER	99				
L(MoxM)TDPFVGQLTFVR	98,0182				
L(MoxM)TDPFVGQLTFVR	99				
LMTDPFVGQLTFVR	85,0639				
gi 47574431	99	29,27%	Chaperonin GroEL (HSP60 family) [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				LQNMGAQMVK	60,16732
				VGAATEVEMK	86,12614
				VGAATEVE(MoxM)KEK	26,80642
				VEDALHATR	37,34149
				VGAATEVE(MoxM)K	43,56282
				ARVEDALHATR	72,40588
				ARVEDALHATR	67,47503
				VTLADLGQAK	74,93921
				VGAATEVEMK	48,1178
				EGVITVEDGK	81,93908
				LAGGVAVIK	73,00824
				EGVITVEDGK	97,36522
				LAGGVAVIK	50,05347
				DKLQNMGAQMVK	99
				YVAAG(MoxM)NPMDLK	55,49904
				AMLEDIAILTGGK	99
				(MoxM)VEGVNLANAVK	95,81521
				GYLSPYFINNPEK	95,4654

				SLNNELDVVEG(MoxM)QFDR	75,26218
				SLNNELDVVEGMQFDR	89,03404
				AAVEEGIVAGGGVALLR	95,00324
				TSDNAGDGTATVLAQAIVR	83,89623
				TSDNAGDGTATVLAQAIVR	88,38272
				TSDNAGDGTATVLAQAIVR	63,05664
gi 33597219	99	15,70%	succinyl-CoA synthetase, alpha chain [Bordetella parapertussis 12822]		
				IGI(MoxM)PGHIHR	51,76204
				IGI(MoxM)PGHIHR	97,53602
				(MoxM)GHAGALISGGADTADAK	98,38944
				(MoxM)GHAGALISGGADTADAK	99
				IGIMPGHIHR	27,52587
				MGHAGALISGGADTADAK	99
				KPVVGFAGVTAPAGK	87,86224
				KPVVGFAGVTAPAGK	88,28697
				DN(MoxM)KKPVVGFAGVTAPAGKR	30,17665
gi 17430065	99	18,43%	PROBABLE ELONGATION FACTOR TU (EF-TU PROTEIN) [Ralstonia solanacearum]		
				KLLDQQAGDNGILLR	34,12925
				LIPIAMEEGLR	88,57556
				TKPHVNVGTIGHVDHGK	98,09971
				LLDQQAGDNGILLR	67,46425
				LLDQQAGDNGILLR	86,21487
				LIPIAMEEGLR	32,87105
				KLLDQQAGDNGILLR	28,77708
				LLDQQAGDNGILLR	83,83946
				QVGVPIIVFLNK	99
				AVDGTFL(MoxM)PVEDVFSISGR	93,95012
				AVDGTFL(MoxM)PVEDVFSISGR	99
				AVDGTFLMPVEDVFSISGR	94,21123
gi 47572950	99	8,21%	Methylmalonyl-CoA mutase, N-terminal domain/subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				LQDDALR	53,46254
				GGVLGA(MoxM)ETGYQR	89,32344
				SSLTDELIR	32,42694
				SGGALLGDR	81,30809
				SGGALLGDR	90,01439
				(MoxM)FAGEGDAFR	91,03033
				LRLDQDDALR	88,68077
				MFAGEGDAFR	98,21198
				IDMLDFAEFVAINK	54,22014
				RIWAVAMR	89,64925
				IQEESMHYEMLK	97,10763
				GGVLGAMETGYQR	95,36945
				HTGEYPIIGVNTFR	90,86576
				IDMLDFAEFVAINK	99
gi 47574956	99	7,18%	Aconitase B [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				INLIIGR	51,68066
				FGGVTLGGK	83,03626
				FGGVTLGGK	98,87684
				LWVAPPTK	56,64175

				LLLPTVGTGGDSHTR	99
				GGVALRPGDGVHSWLNR	81,71106
				QVAELIELIK	96,87541
gi 47574115	99	10,43%	Translation elongation factors (GTPases) [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				NIGISAHIDAGK	93,90147
				MAASLGFK	54,60645
				MGIALGR	62,24189
				NIGISAHIDAGK	99
				EFGVEANVGKQVAYR	95,09143
				IGEVHDGAATMDWMEQEQR	44,66668
				AEVPLSE(MoxM)FGYSTTLR	94,77334
gi 56477558	99	2,73%	adenosyl-cobalamine enzyme similar to methylmalonyl-CoA mutase [Azoarcus sp. EbN1]		
				YLAEIADTVR	96,01117
				GGVLGA(MoxM)ETGYQR	89,32344
				(MoxM)FAGEGDAFR	91,03033
				MFAGEGDAFR	98,21198
				GGVLGAMETGYQR	95,36945
gi 47573811	99	6,69%	ATPases with chaperone activity, ATP-binding subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				YTLDLTER	57,23187
				SKNNPVLIGEPGVGK	99
				LIGAPPGYVGYDEGGYLTEAVR	98,38573
				AHPDVFNVLLQVLDDGR	90,28598
				AHPDVFNVLLQVLDDGR	88,14347
gi 47575230	99	10,53%	Citrate synthase [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				L(MoxM)GFGHR	46,1032
				IFILHADHEQNASTSTVR	88,54522
				IFILHADHEQNASTSTVR	99
				IFILHADHEQNASTSTVR	58,46764
				MPTLVAMAYK	69,99115
				KLYPNVDFYSGIVQR	99
gi 51596406	99	9,01%	hypothetical protein YPTB2080 [Yersinia pseudotuberculosis IP 32953]		
				NEIVNFVLR	68,48296
				NNEAFLDR	89,33221
				DYAGVDEG(MoxM)SGLSTR	91,14343
				DYAGVDEGMSGLSTR	94,21791
				TEPGDENNQDISALVGK	99
				KQILYLLGPVGGGK	25,09648
gi 47575151	99	4,82%	Ribosomal protein S1 [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				RAVVEAS(MoxM)GEER	70,02404
				RAVVEASMGEER	98,76228
				AVVEASMGEER	99
				VRHPSEVVTVGQELTAK	81,08815
gi 33595927	99	7,61%	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [Bordetella parapertussis 12822]		
				ESHVHDVQITK	33,69655
				LVPEGIEGR	60,59156
				NITLNIPLVSAA(MoxM)DTVTEAR	70,45801
				NITLNIPLVSAAMDTVTEAR	99
				NITLNIPLVSAAMDTVTEAR	99

gi 47575379	99	5,57%	2-oxoglutarate dehydrogenase complex, dehydrogenase (E1) [Rubrivivax gelatinosus PM1]	WADLDPLKR	54,65252
				KQVHVQSLIAAYR	69,68835
				DVAHAPVVEFAQR	82,88737
				KQVHVQSLIAAYR	94,43655
				KQVHVQSLIAAYR	99
				QVHVQSLIAAYR	32,31456
				GVQEIVIGMAHR	41,63246
				LAERITTIPIK	30,32181
gi 47573321	99	10,31%	Ser protein kinase [Rubrivivax gelatinosus PM1]	NEIVNFVLR	68,48296
				IEKPAGIANPK	66,92997
				IEKPAGIANPK	70,91518
				NNEAFLDR	89,33221
				DYAGVDEG(MoxM)SGISTR	91,14343
				DYAGVDEGMSGISTR	94,21791
				KQILYLLGPVGGGK	25,09648
				YVTYADYWIQDQEYR	84,46193
gi 47575132	99	9,60%	Predicted transcriptional regulator [Rubrivivax gelatinosus PM1]	RHELVESTR	59,19311
				RHELVESTR	31,80107
				HELVESTR	63,50482
				GPGGGYSLGR	97,10759
				GPGGGYSLGR	99
gi 47575133	99	8,62%	Cysteine sulfinase desulfurase/cysteine desulfurase and related enzymes [Rubrivivax gelatinosus PM1]	SDELAHSSLR	61,64577
				SDELAHSSLR	92,15999
				GIVFHVDAQAATGK	85,19971
				SHAWGWEAEEAVEK	99
gi 52308294	99	10,15%	TufB protein [Mannheimia succiniciproducens MBEL55E]	TTLTAAITTVLSK	72,36991
				TKPHVNVGTIGHVDHGK	98,09971
				QVGVPIIVFLNK	99
gi 28866546	99	3,46%	enolase [Streptococcus sobrinus]	WGAEVFHALKK	88,87766
				YNQLLR	43,62374
				WGAEVFHALK	95,51604
				WGAEVFHALK	97,97989
gi 34103100	99	8,26%	protein kinase [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]	NEIVNFVLR	68,48296
				LKEPENSSLYSK	53,13882
				NNEAFLDR	89,33221
				DYAGVDEG(MoxM)SGLSTR	91,14343
				DYAGVDEGMSGSTR	94,21791
				KQILYLLGPVGGGK	25,09648
gi 52209532	99	3,54%	ClpB heat-shock protein [Burkholderia pseudomallei K96243]	VLVDEPSVEATIAILR	99
				AHPDVFNVLLQVLDGGR	90,28598

gi 33596174	99	9,24%	30S ribosomal protein S2 [Bordetella parapertussis 12822]	AHPDVFNVLLQVLDDGR	88,14347
				MAPYIFGHR	67,49928
				EGLLFQR	46,15117
				MAPYIFGHR	95,71319
				WLGGMILTDFK	99
gi 47575401	99	14,81%	Uncharacterized host factor I protein [Rubrivivax gelatinosus PM1]	GQLLQDPFLNLLR	99
				GQLLQDPFLNLLR	99
gi 33591525	99	5,49%	dihydroxy-acid dehydratase [Bordetella pertussis Tohama I]	YHIEDVHR	62,32299
				YHIEDVHR	53,72263
				YYEQDDASVLPR	99
				LNIPVVFVSGGPMIAGK	91,76992
gi 47574921	98	2,40%	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (polynucleotide phosphorylase) [Rubrivivax gelatinosus]	IRDVIGK	26,59965
				DGLLHISQIAHQR	98,73515
				DGLLHISQIAHQR	97,27064
gi 47574136	98	30,92%	Ribosomal protein S5 [Rubrivivax gelatinosus PM1]	MIQVNR	44,54592
				SLGSSNPYNMVR	99
				AVFEVMGVTDIVAK	53,4512
				VLLAPAAPGTGIIAGGP(MoxM)R	88,6992
gi 23015051	98	4,65%	Aconitase B [Magnetospirillum magnetotacticum MS-1]	AGLLTVEKK	40,80142
				AGLLTVEK	61,30786
				LLLPTVGTGGDSHTR	99
				GGVALRPGDGVHISWLNLR	81,71106
gi 47574122	98	23,08%	Ribosomal protein S19 [Rubrivivax gelatinosus PM1]	LGEFALTR	94,38024
				QHVPVYVTDQMVGHK	88,43944
				QHVPVYVTDQMVGHK	93,15161
gi 53803421	98	8,20%	ribosomal protein L14 [Methylococcus capsulatus str. Bath]	KGEVYNAVVR	95,08676
				KGEVYNAVVR	99
gi 33591288	96	3,07%	DNA-directed RNA polymerase beta chain [Bordetella pertussis Tohama I]	VIVSQLHR	66,32112
				(MoxM)IKVYLAVKR	49,75444
				STGPYSLVTQQPLGGK	88,94272
				LNEYGFLETPYR	92,58458
gi 22121828	93	4,86%	Cpn60 [Oligella ureolytica]	EGVITVEDGK	81,93908
				EGVITVEDGK	97,36522
gi 15595337	95	11,23%	alkyl hydroperoxide reductase subunit C [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	VWHETSPAAGK	89,55413
				GTFVINPEGVIK	97,25514
gi 33598379	90	6,43%	hypothetical protein BPP3870 [Bordetella parapertussis 12822]	NEIVNFVLR	68,48296
				IEKPAGIANPK	66,92997

				IEKPAGIANPK	70,91518
				LKEPENSSIYSK	53,13882
				KQILYLLGPPVGGGK	25,09648
gi 52211223	88	17,88%	50S ribosomal protein L5 [Burkholderia pseudomallei K96243]	IAGQKPVVTK	91,60726
				GNYNIGVK	73,69037
				EQIIFPEIDYDKIDALR	35,02133
gi 24211511	87	6,26%	Argininosuccinate synthase (Citrulline--aspartate ligase)	EDGVNIWGDGSTYK	33,45857
				AYSTDSNMLGATHEAK	97,59985
gi 53724770	83	11,24%	electron transfer flavoprotein, beta subunit [Burkholderia mallei ATCC 23344]	VKSDGTGVDIANVK	95,54212
				MS(MoxM)NPFDEIAVEEAVR	34,37045
gi 37958861	83	2,04%	putative pyruvate dehydrogenase E1 complex [uncultured bacterium]	QGTEAEIHK	32,21696
				VVPILVDEAR	95,50504
gi 47574767	72	3,29%	Aspartokinases [Rubrivivax gelatinosus PM1]	YMELAVR	69,97692
				VSIVGIGMR	74,09941
gi 17936810	69	5,90%	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein [sn-Glycerol-3-phosphate] [A. tumefaciens]	MAQIDIR	28,12485
				EPAVFLFDEPLSNLDAK	86,48896
gi 53723784	62	4,45%	enolase [Burkholderia mallei ATCC 23344]	GIANSILIK	30,70999
				SAFYNLR	62,86421
				YNQLLR	43,62374

ANNEXE 12

Protéines identifiées chez *S. natans* 15291 sous forme filamenteuse

Accession	Score (%)	Coverage(%)	Description	Peptide	Score(%)
gi 47573980	99	23,57%	F0F1-type ATP synthase, beta subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]	VGLFGGAGVGK	97,65428999
				YVPLKETIR	26,38774027
				I(MoxM)DVLGSPIDER	36,16528226
				DVLFFVDNIYR	33,43392056
				TIALGSSDGLRR	42,53355516
				AHSGLSVFAGVGER	99,00000095
				VGLFGGAGVGK	61,05535721
				MPSAVGYQPTLAEE(MoxM)GR	99,00000095
				YTLAGTEVSALLGR	99,00000095
				MPSAVGYQPTLAEEMGR	99,00000095
				KAPAYDELSPSQELLETKIK	37,22957003
				KAPAYDELSPSQELLETKIK	37,41378161
				APAYDELSPSQELLETKIK	70,11586644
gi 33597219	99	13,99%	succinyl-CoA synthetase, alpha chain [Bordetella parapertussis 12822]	IGI(MoxM)PGHIHR	89,84351192
				(MoxM)GHAGALISGGADTADAK	99,00000095
				KPVVGFIAAGVTAPAGK	99,00000095
				MGHAGALISGGADTADAK	96,7302091
				KPVVGFIAAGVTAPAGK	99,00000095
				KPVVGFIAAGVTAPAGK	92,08469136
gi 23015051	99	9,64%	Aconitase B [Magnetospirillum magnetotacticum MS-1]	MTTVGSQDTTGPMTTR	91,99190851
				AGLLTVEK	25,49408423
				LLLPDTVGTGGDSHTR	99,00000095
				VEQAFELSDAAAER	98,60057801
				GGVALRPGDGVHISWLNLR	82,35025303
				KGNLVAYVGDVVTGSSR	99,00000095
				KGNLVAYVGDVVTGSSR	98,05105199
gi 47574431	99	23,83%	Chaperonin GroEL (HSP60 family) [Rubrivivax gelatinosus PM1]	DKLQNMGAQ(MoxM)VK	72,82519653
				VGAATEVEMK	82,13052801
				VTLADLGQAK	93,43903324
				VEDALHATR	25,76580469
				VEDALHATR	94,77010426
				VGAATEVE(MoxM)K	29,94470524
				ARVEDALHATR	53,56496744
				ARVEDALHATR	48,2655717
				EGVITVEDGK	92,33973673
				LAGGVAVIK	30,87353064
				DKLQNMGAQMVK	63,33917071
				YVAAGMNP(MoxM)DLK	55,12299148
				AMLEDIAILTGGK	72,81687416
				MVEGVNLANAVK	57,73471801
				YVAAGMNPMDLK	99,00000095
KA(MoxM)LEDIAILTGGK	34,64549597				

				SLNNELDVVEG(MoxM)QFDR	99,00000095
				TSDNAGDGTATVLAQAIVR	92,00587444
				SLNNELDVVEGMQFDR	59,92454284
gi 47572950	99	5,11%	Methylmalonyl-CoA mutase, N-terminal domain/subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				SGGALLGDR	75,84157889
				LRLDQDDALR	65,37755085
				GGVLGAMETGYQR	99,00000095
				VGNSGVSIATLDDLK	99,00000095
				HTGEYPIIGVNTFR	88,79824272
				VGNSGVSIATLDDLK	99,00000095
gi 33595927	99	5,97%	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [Bordetella parapertussis 12822]		
				ESHVHDVQITK	97,38730019
				NITLNIPLVSAAMDTVTEAR	98,27026371
				NITLNIPLVSAAMDTVTEAR	99,00000095
				NITLNIPLVSAAMDTVTEAR	99,00000095
gi 47575151	99	9,29%	Ribosomal protein S1 [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				HPSEVVTVGQELTAK	37,12681046
				AFLPGSLLDTRPVK	92,21149421
				RAVVEAS(MoxM)GEER	28,06648081
				RAVVEAS(MoxM)GEER	94,2454239
				RAVVEAS(MoxM)GEER	80,87640998
				ENAGTTSLGALLK	59,7277776
				AVVEASMGEER	99,00000095
				VRHPSEVVTVGQELTAK	99,00000095
gi 17548553	99	5,68%	ACONITATE HYDRATASE 2 TRANSMEMBRANE PROTEIN [Ralstonia solanacearum GMI1000]		
				VPPGVDDAAK	25,80006032
				VPPGVDDAAK	50,09601259
				RGPIQFIEDLKK	95,2657014
				MTTVGSQDTTGPMTR	91,99190851
				LLLPDTVGTGGDSHTR	99,00000095
				GPIQFIEDLKK	99,00000095
				RGPIQFIEDLK	72,09868479
gi 17430065	99	11,36%	PROBABLE ELONGATION FACTOR TU (EF-TU PROTEIN) [Ralstonia solanacearum]		
				LIAPIA(MoxM)EEGLR	52,25921642
				LLDQGGAGDNGILLR	25,32066087
				AVDGTFLMPVEDVFSISGR	73,10032087
				AVDGTFLMPVEDVFSISGR	69,97581029
				LLDQGGAGDNGILLR	48,3163814
				LIAPIAMEEGLR	99,00000095
				KLLDQGGAGDNGILLR	87,50276164
				LLDQGGAGDNGILLR	50,86551504
				LLDQGGAGDNGILLR	37,71668244
				AVDGTFL(MoxM)PVEDVFSISGR	92,64721602
				AVDGTFL(MoxM)PVEDVFSISGR	99,00000095
				LIAPIAMEEGLR	27,76698713
gi 17429771	99	12,35%	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE [Ralstonia solanacearum]		
				GVLGYTEDK	60,12919496
				GLMTTVHAATATQK	99,00000095

				GVLGYTEDKVVATDFR	99,00000095
				VVSWYDNEWGYSNK	99,00000095
gi 17430046	99	11,38%	ELONGATION FACTOR G (EF-G PROTEIN) [Ralstonia solanacearum]	LAAEDPSFR	99,00000095
				NIGISAHIDAGK	94,23856311
				LAFVNK	30,37988693
				IGEVHDGAAT(MoxM)DWMEQEQR	32,43465536
				FSALAFK	87,04306223
				IGEVHDGAATMDWMEQEQR	44,31607701
				MVFPEPVISQAVEPK	53,65246206
				FNIIDTPGHVDFTIEVER	97,33254509
gi 17428283	99	1,99%	OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE OXIDOREDUCTASE PROTEIN [Ralstonia solanacearum]	LTAAEGLER	99,00000095
				GRLNVLVNTLGK	74,15510172
				GRLNVLVNTLGK	96,7659432
				LNVLVNTLGK	97,72415222
gi 47574355	99	10,16%	Enolase [Rubrivivax gelatinosus PM1]	TLIDL DGT DNK	97,83247435
				AGYTAVISHR	57,8290183
				RAGYTAVISHR	30,54067674
				VQLVGDDL FVT NTK	99,00000095
				AAAEESGLPLYR	97,12599448
gi 47573321	99	3,59%	Putative Ser protein kinase [Rubrivivax gelatinosus PM1]	IEKPAGIANPK	98,48725413
				KQILYLLGPVGGGK	97,72834189
				KQILYLLGPVGGGK	99,00000095
gi 47574134	99	5,85%	Ribosomal protein L6/L9E [Rubrivivax gelatinosus PM1]	QVVGQIAAEVR	95,21697179
				QVVGQIAAEVR	98,56897342
				QVVGQIAAEVR	99,00000095
gi 47574122	99	23,08%	Ribosomal protein S19 [Rubrivivax gelatinosus PM1]	LGEFALTR	95,086812
				QHVPVYVTDQMVGHK	98,72409416
				LGEFALTR	98,79323878
gi 47574131	99	25,77%	Ribosomal protein L5 [Rubrivivax gelatinosus PM1]	IAGQKPVVTK	91,40298569
				MYEFLDR	61,30427598
				ITLNMGVSEAVSDKK	99,00000095
				KAIAGFK	48,51985266
				GNYNIGVK	80,17606106
gi 47575227	99	7,55%	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, flavoprotein subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]	TGHAMLHTLYQQNVK	99,00000095
				RLPSVFEIGHNFANVDITK	71,57398024
				VVYELEHFGMPFDR	99,00000095
gi 47575464	99	10,73%	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) [Rubrivivax gelatinosus PM1]	ASLEASVR	50,49506422
				LLITGLLSNR	99,00000095
				EAIAGDFLDGLSR	99,00000095

gi 33601239	99	3,30%	ATP-dependent protease La [Bordetella bronchiseptica RB50]	RAIVAQFEQYVK	34,68111479
				NPLFLLDEIDKLGMDFR	99,00000095
				NPLFLLDEIDKLGMDFR	99,00000095
gi 47574115	99	9,00%	Translation elongation factors (GTPases) [Rubrivivax gelatinosus PM1]	MAASLGFK	57,39259906
				NIGISAHIDAGK	94,23856311
				MGIALGR	27,1341335
				LAFVNK	30,37988693
				EFGVEANVGKPVAYR	99,00000095
				IGEVHDGAAT(MoxM)DWMEQEQR	32,43465536
				IGEVHDGAATMDWMEQEQR	44,31607701
gi 17429091	99	2,53%	2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE PROTEIN [Ralstonia solanacearum]	IHTFIATSALHMEK	99,00000095
				IHTFIATSALHMEK	99,00000095
gi 47573135	98	5,45%	S-adenosylhomocysteine hydrolase [Rubrivivax gelatinosus PM1]	AINVNDVTK	57,53887461
				KSAQIIGVTEETTTGVHR	99,00000095
				SAQIIGVTEETTTGVHR	93,3575884
gi 37958837	98	11,28%	putative HSP70 [uncultured bacterium]	ANGLSEDEIQK	62,95099638
				VKEFFGK	79,79160567
				KDVNPDEAVAVGAAIQGVLGGER	37,64363539
				AKLESLVEELIER	98,33917546
				GTPQIEVSFDIDANGILHVGA	52,58537608
gi 24985765	98	5,66%	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Pseudomonas putida KT2440]	LYEIGAGTSEIR	90,2621631
				DQVRTFVAAELAPR	28,57673419
				DQVRTFVAAELAPR	38,11087801
				LYEIGAGTSEIR	99,00000095
gi 9655083	98	2,12%	polyribonucleotide nucleotidyltransferase [Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961]	VAGTATGVTALQMDIK	98,37146829
				VAGTATGVTALQMDIK	97,33615857
gi 47573313	98	4,81%	3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase [Rubrivivax gelatinosus PM1]	VYFEKPR	95,05860276
				ELASGISAPIGFK	99,00000095
gi 15599469	97	9,96%	50S ribosomal protein L1 [Pseudomonas aeruginosa PAO1]	VVGQLGQILGPR	99,00000095
				VGTVTPDVATAVK	92,41771365
gi 1032300	96	5,84%	ribosomal protein L2	GTA(MoxM)NPVDHPHGGGEGR	91,34402599
				GTAMNPVDHPHGGGEGR	97,12599964
gi 47574141	95	17,36%	Ribosomal protein S13 [Rubrivivax gelatinosus PM1]	MTIEGDLRR	69,7394336
				MTIEGDLR	93,41841053
				HAEIGLTAIYGIGR	86,52988825
gi 33596174	96	5,62%	30S ribosomal protein S2 [Bordetella parapertussis 12822]	MAPYIFGHR	75,62468103
				(MoxM)APYIFGHR	90,9210607

				EGLLFQR	65,62780202
gi 47574112	95	5,88%	DNA-directed RNA polymerase, beta' subunit/160 kD subunit [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				KGLADTALK	56,22280633
				KPETINYR	27,44173511
				APEIIVR	40,48697845
				TFHIGGAASR	64,28163308
				HIEVIVR	54,32118898
				LLQSGFR	72,00810539
				LMALELFKPFIFSR	43,72617863
				EGLNVLQYFISTHGAR	74,99845807
				LGIQAFEPVLEIGK	56,08083192
gi 34104970	95	4,30%	probable isocitrate dehydrogenase (NADP) [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]		
				AVMPESTFAR	96,10967349
				MLSIVPLMAGGGMYETGAGGSAPK	92,70715489
gi 33594763	95	22,64%	50S ribosomal protein L24 [Bordetella parapertussis 12822]		
				KGDEVIVLTGR	99,00000095
				VDADHVLVEGVNVVK	71,75917463
gi 47573782	94	2,68%	Phosphoenolpyruvate synthase/pyruvate phosphate dikinase [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				ALAEAGAEIR	67,90855515
				YEPEEENPMLGFR	99,00000095
gi 15595337	93	11,23%	alkyl hydroperoxide reductase subunit C [Pseudomonas aeruginosa PAO1]		
				VWHETSPA VGK	97,33278985
				GTFVINPEGVIK	80,48579596
gi 53724770	91	11,24%	electron transfer flavoprotein, beta subunit [Burkholderia mallei ATCC 23344]		
				VKSDGTGVDIANVK	98,46480527
				MSMNFDEIAVEEAVR	43,09440875
gi 47575392	89	21,99%	COG0105: Nucleoside diphosphate kinase [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				TLSIIKPDAAK	82,32413594
				ELMGATDPKK	71,37024834
				LVHLSR	28,45062064
				FEGAGLK	64,98794347
gi 53725848	87	4,70%	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit ClpA [Burkholderia mallei ATCC 23344]		
				EVTGANVLVAIFGEK	96,95362471
				LIGAPPGYVGFQDQGLL TEAVTK	47,46487111
gi 46370300	86	6,80%	GltA [Bartonella phoceensis]		
				L(MoxM)GFGHR	55,90617826
				IFILHADHEQNASTSTVR	91,78605405
gi 53717147	85	2,49%	outer membrane porin OpcP, putative [Burkholderia mallei ATCC 23344]		
				GVEDLGGGLK	85,9267721
				GVEDLGGGLK	84,91365409
gi 47574921	84	4,79%	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase (polynucleotide phosphorylase) [Rubrivivax gelatinosus PM1]		
				IRDVIGK	28,29495124
				TVRPIEIR	50,64800445
				AHVAGIAMGLIK	61,39671791
				DGLLHISQIAHQ	81,45721325