

---

## 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; Gagliano *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  $\mu\text{m}$  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).

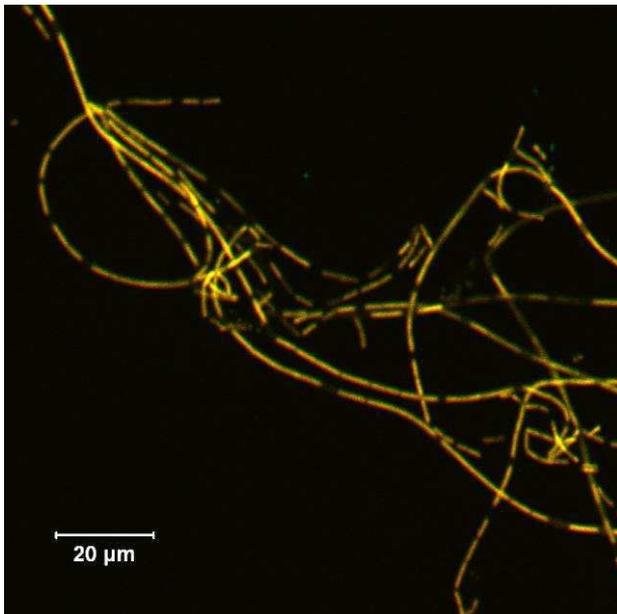


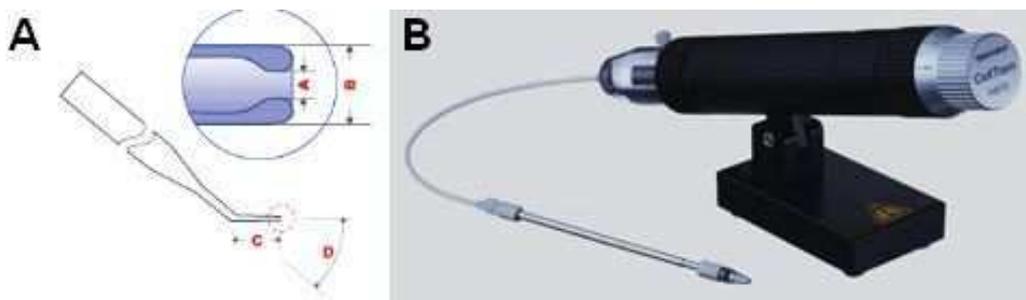
Figure 41 : Bactéries filamenteuses de type *Sphaerotilus natans* dans les boues activées issues de la station de traitement des eaux usées d'une usine agroalimentaire. Double marquage FISH à l'aide des sondes EUB338-FITC et SNA-Cy3.

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<sup>ème</sup> 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<sup>®</sup> (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).

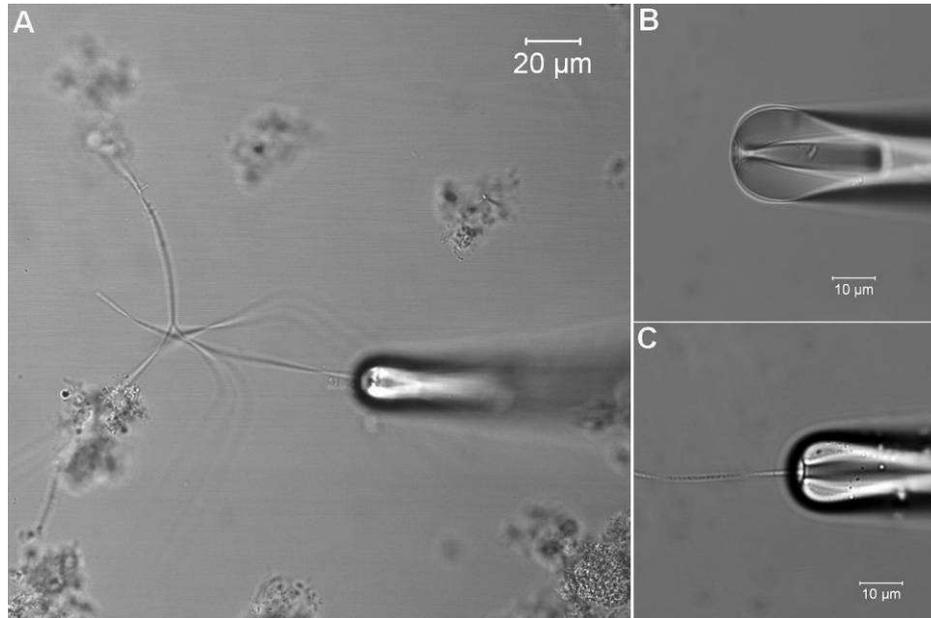


**Figure 42 :** A) Schéma des microcapillaires CustomTips type II utilisé pour l'isolement de *Sphaerotilus natans* à partir de boues activées. Les capillaires utilisés ont un diamètre interne A de 5 µm et un diamètre externe B de 10 µm et sont droits. B) Photographie du porte-capillaire et microinjecteur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

L'aspiration est réalisée grâce à un microinjecteur manuel hydraulique de type CellTram<sup>®</sup> 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.

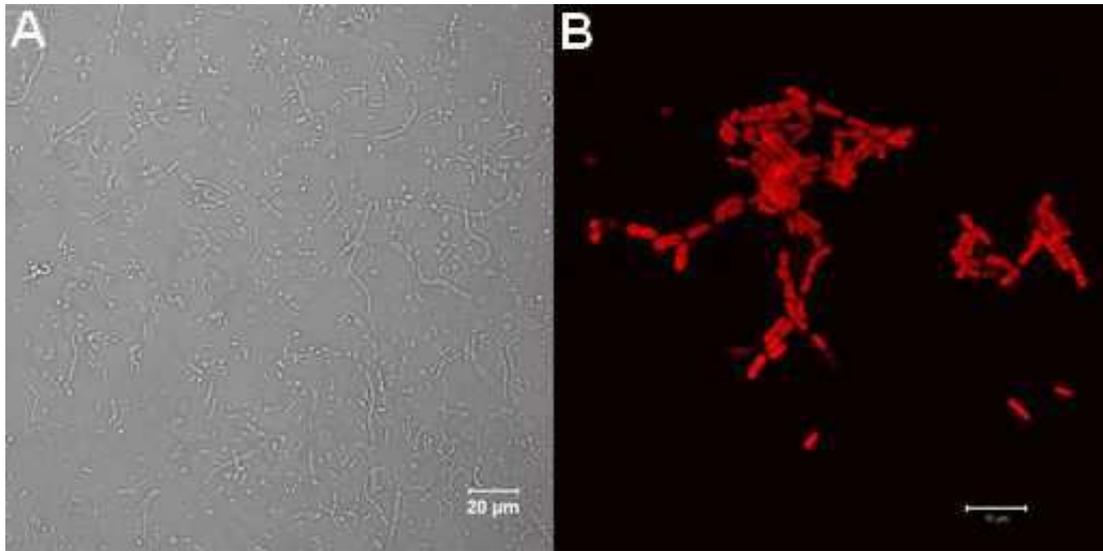
Des filaments courts et des cellules dispersées ont ainsi été isolés par ce système de micromanipulation (cf. Figure 43).



**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.

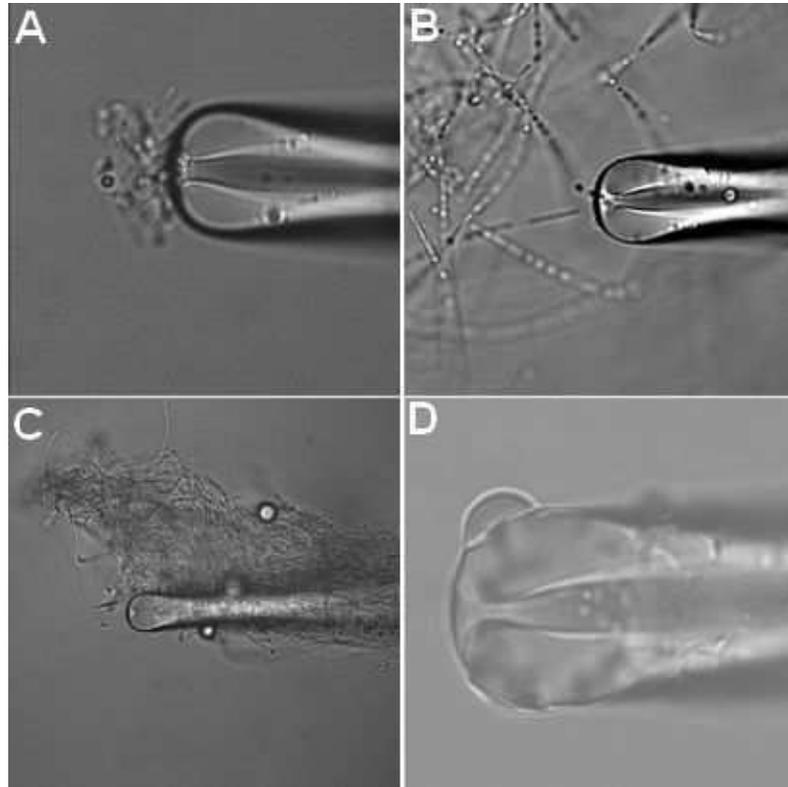
On constate que l'ARNr 16S de la bactérie s'hybride avec la sonde SNA, ce qui indique que cette bactérie appartient très certainement à l'espèce *S. natans*.

### 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<sup>®</sup> Oil. Une solution possible serait d'utiliser un microinjecteur de type CellTram<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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 aérobic 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<sup>f</sup> 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<sup>g</sup> 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.

<sup>f</sup> Les photographies des bactéries figurent dans l'annexe 1

<sup>g</sup> 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.

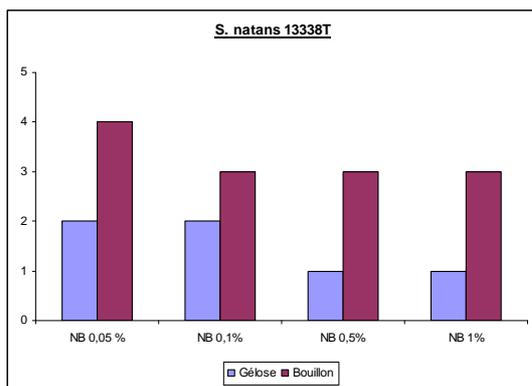
Les morphologies adoptées en fonction de la concentration en nutriments du milieu sont représentées sous formes d'histogrammes qui correspondent pour chacune des souches à la proportion de filaments et de cellules dispersées. Les critères d'évaluation (cf. Tableau 13)

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

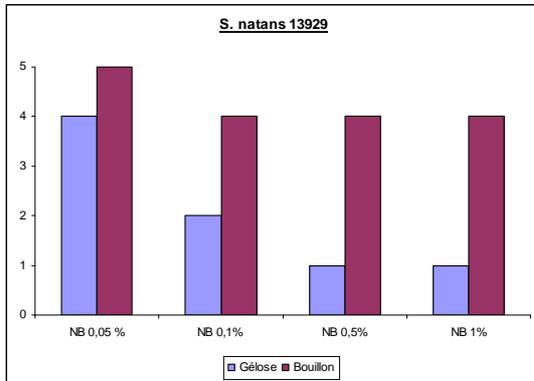
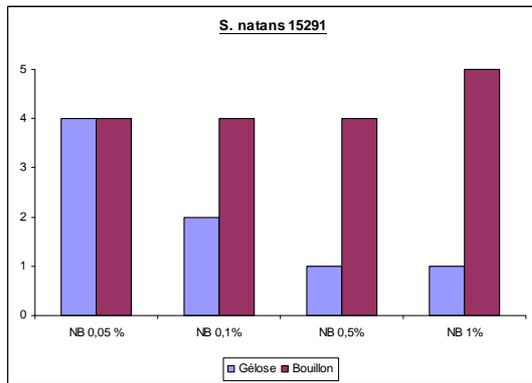


Figure 47 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 13929 en fonction de la concentration en substrat du milieu

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

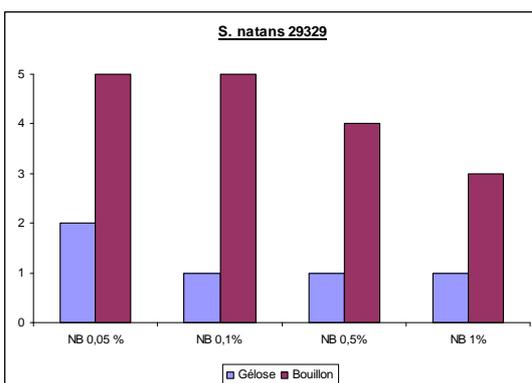


**Figure 48 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 15291 en fonction de la concentration en substrat du milieu**

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



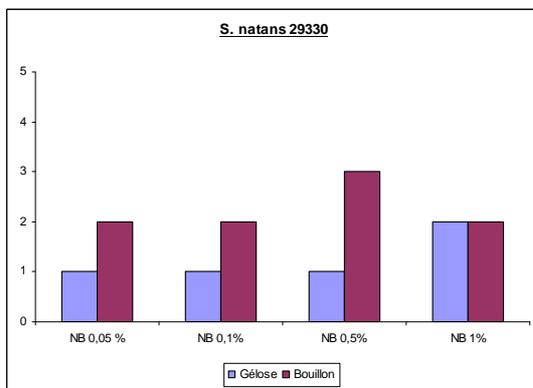
**Figure 49 : Histogrammes récapitulatifs des morphologies adoptées par la souche *S. natans* 29329 en fonction de la concentration en substrat du milieu**

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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$ ). 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%
- MgSO<sub>4</sub> 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.

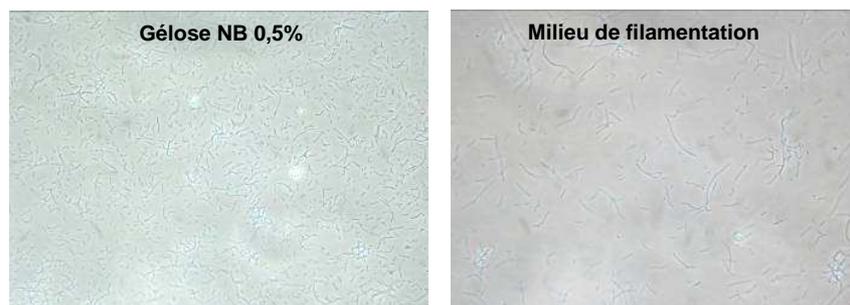


Figure 51 : Morphologies adoptées par la souche 13338<sup>T</sup> (X 500).

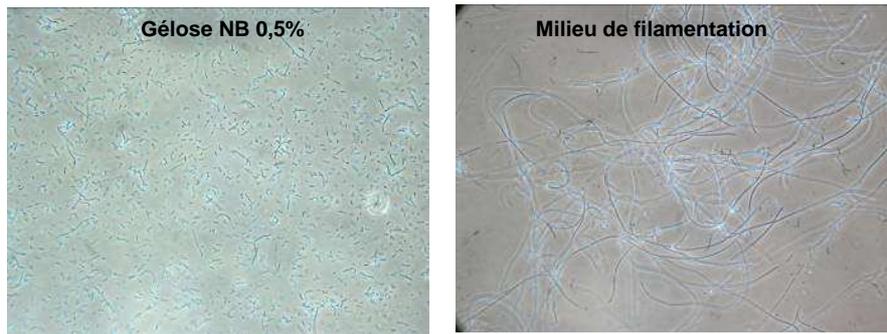


Figure 52 : Morphologies adoptées par la souche 13929 (X 500).

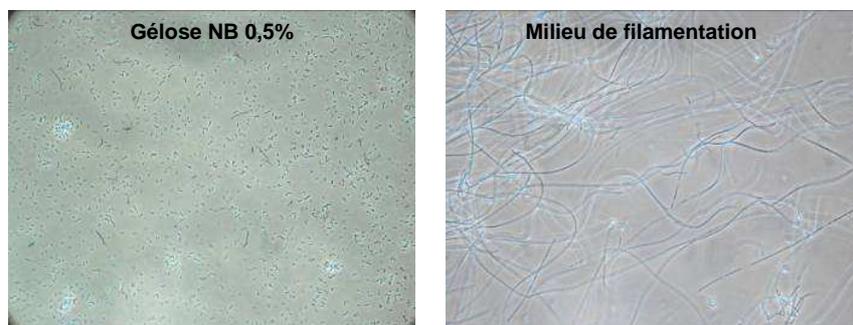


Figure 53 : Morphologies adoptées par la souche 15291 (X 500).

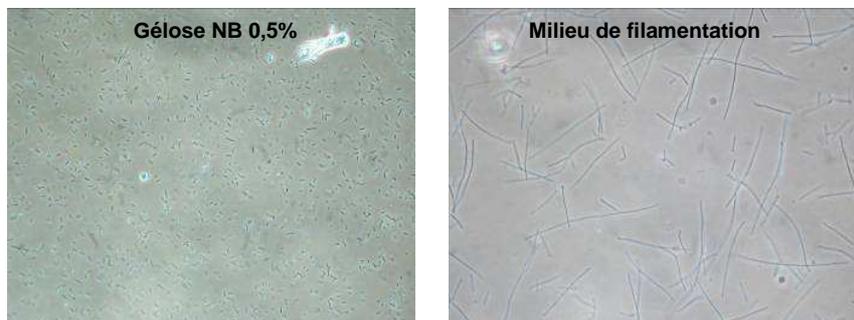


Figure 54 : Morphologies adoptées par la souche 29329 (X 500).

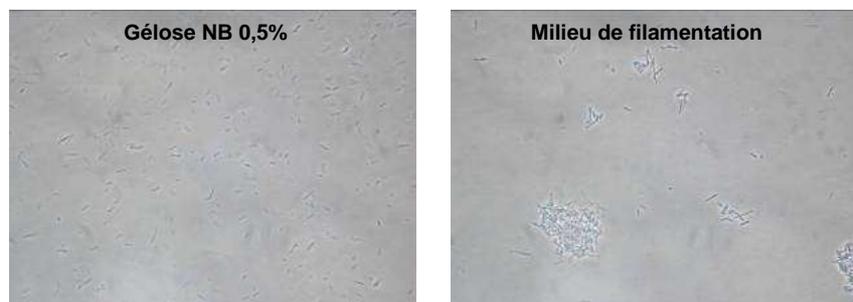


Figure 55 : Morphologies adoptées par la souche 29330 (X 500).

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  $\mu\text{m}$ ) 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<sup>h</sup> (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).

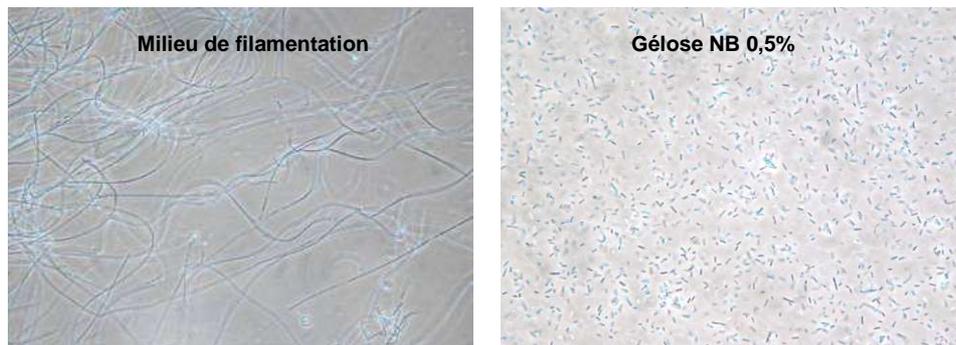


Figure 56: Observations réalisées pour la souche *S. natans* 15291 (X 500)

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.

---

<sup>h</sup> La composition de la gélose PCA est donnée en annexe 2.

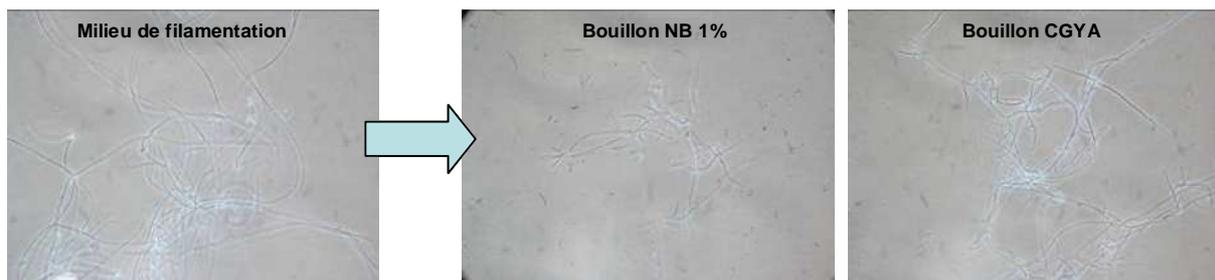
### ✓ *Transfert en bouillon*

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  $\mu\text{m}$ , 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.

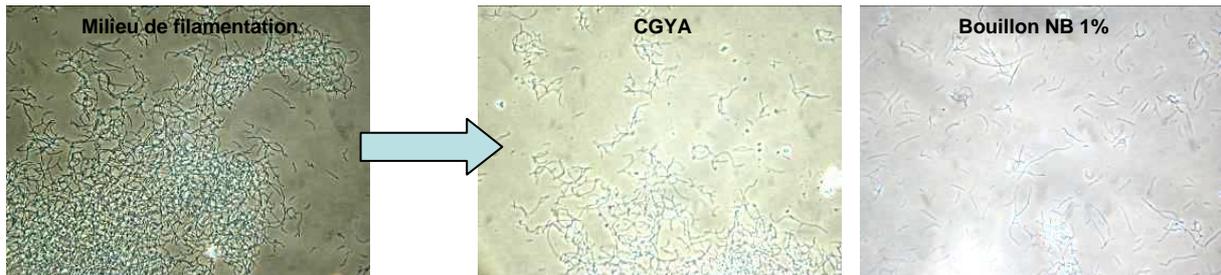


Figure 58 : Observations réalisées pour la souche 13338<sup>T</sup> (X500).

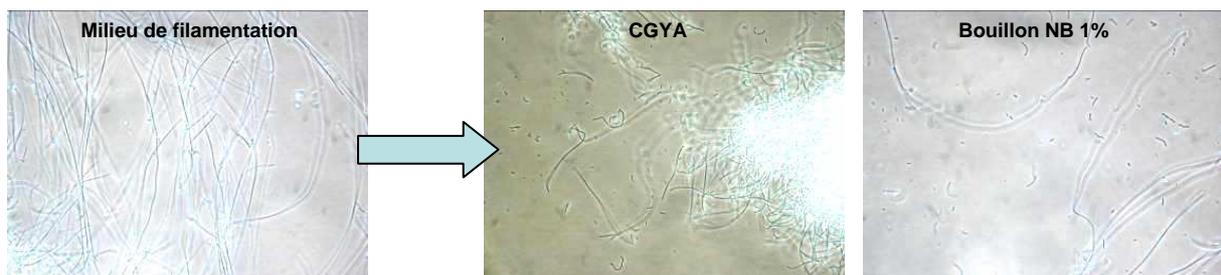


Figure 59 : Observations réalisées pour la souche 15291 (X500).

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

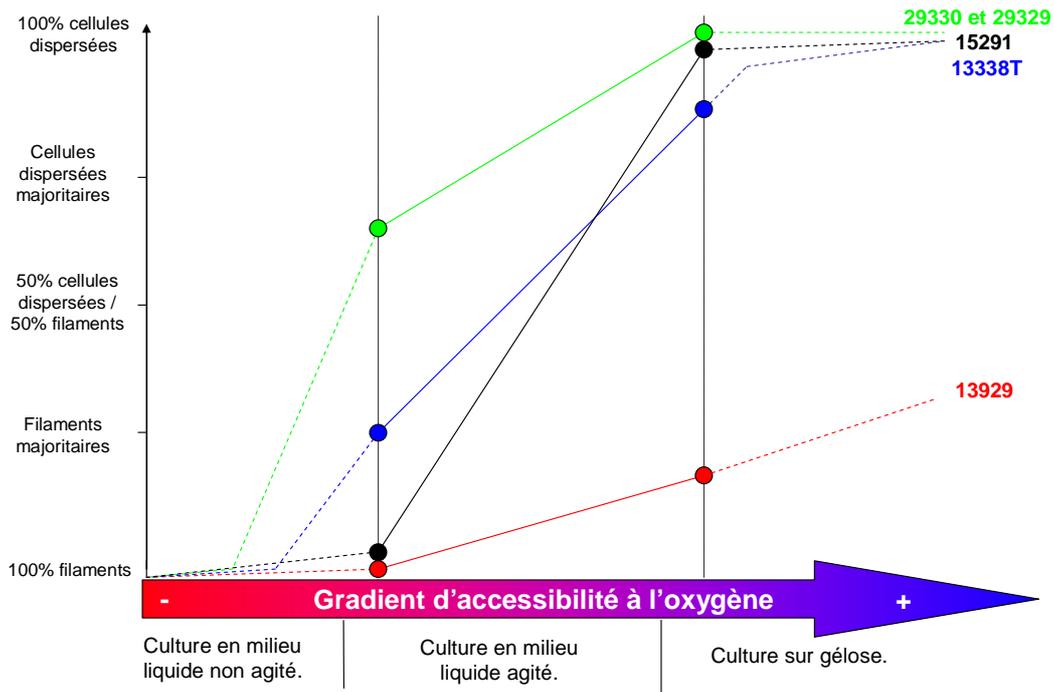
60). On s'aperçoit en effet que le type de croissance du microorganisme suit un gradient d'oxygène. De manière générale, plus l'oxygène est facilement accessible et plus la bactérie va avoir tendance à adopter la forme monocellulaire, au contraire moins il est accessible pour la bactérie plus elle va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

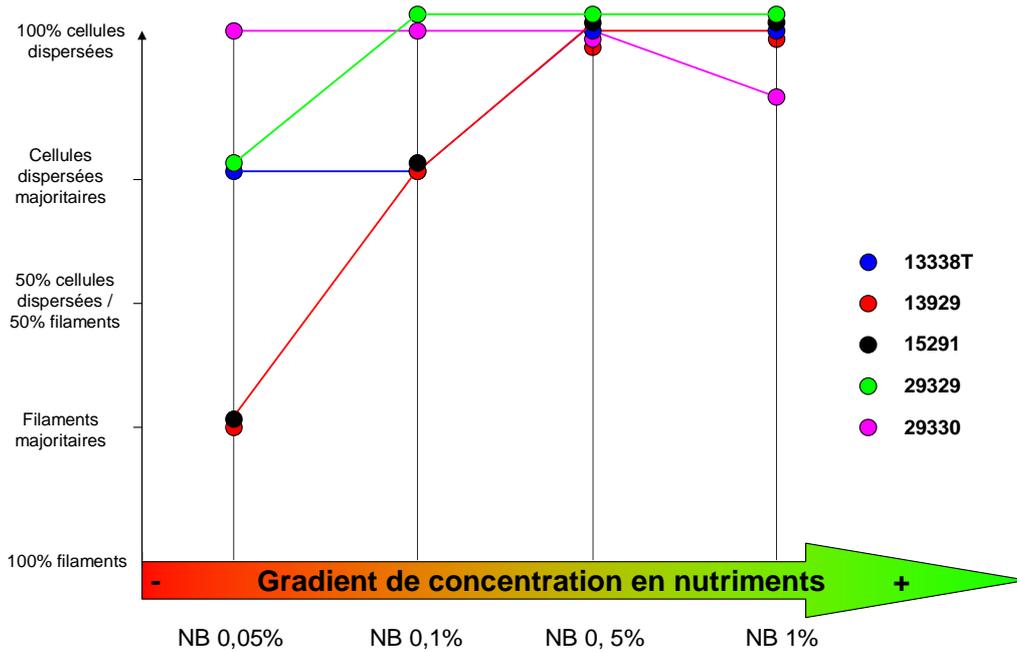
Les portions de droite en pointillés ont été déduites à partir de données de travaux précédents (Gaval, 2001a) pour les souches 13338T, 13929 et 15291, et à partir de résultats obtenus au cours de cette étude et non présentés ici. Les points correspondent aux observations précédemment décrites dans cette 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.

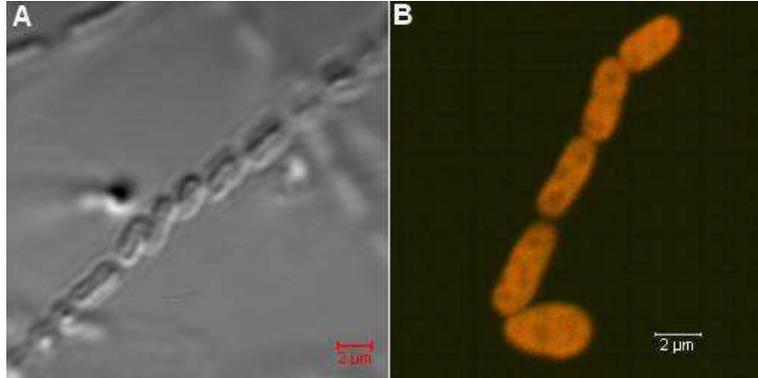
Il a été démontré que le passage d'une morphologie à l'autre est un phénomène réversible. Cependant, la transition vers la forme dispersée à partir de filaments est très difficile à obtenir en milieu liquide, et cela quelles que soient les conditions de cultures appliquées. Si l'apparition d'une forte 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<sup>-1</sup> 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).

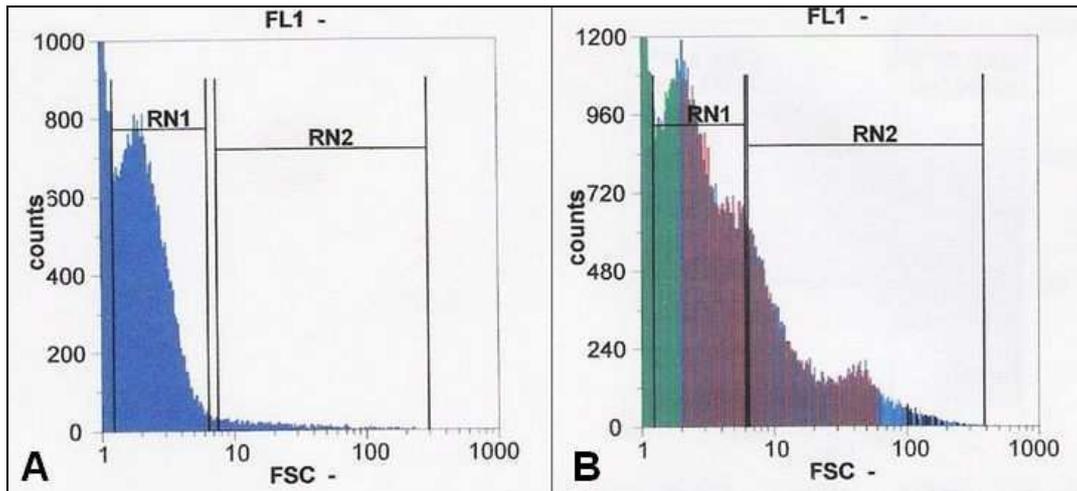


Figure 64 : Histogramme obtenu à A) T0 et B) T19 heures lors du suivi des différentes classes de taille au cours du phénomène de filamentation. La région RN1 correspond aux bactéries sous forme monocellulaire, et la région RN2 correspond aux éléments de taille plus importante, les filaments. L'axe des 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).

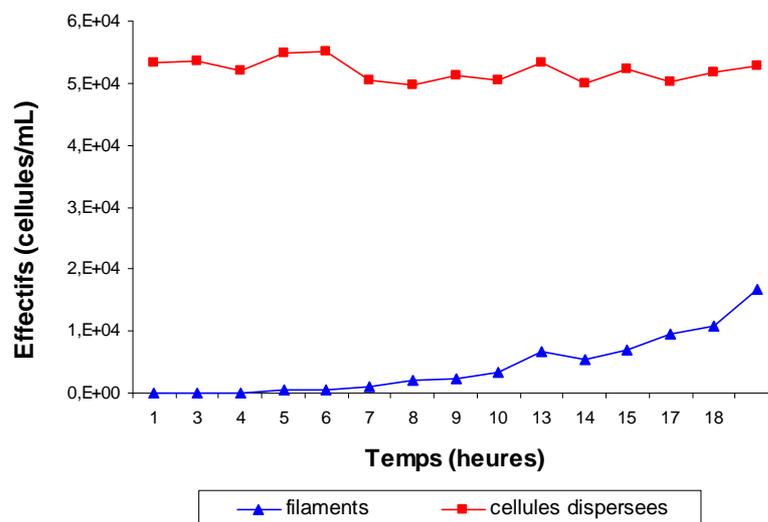


Figure 65 : Évolution des populations monocellulaires (courbe rouge) et filamenteuses (courbe bleue) au cours du processus de filamentation de la souche *S. natans* 15291.

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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>.

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<sup>ème</sup> 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 :

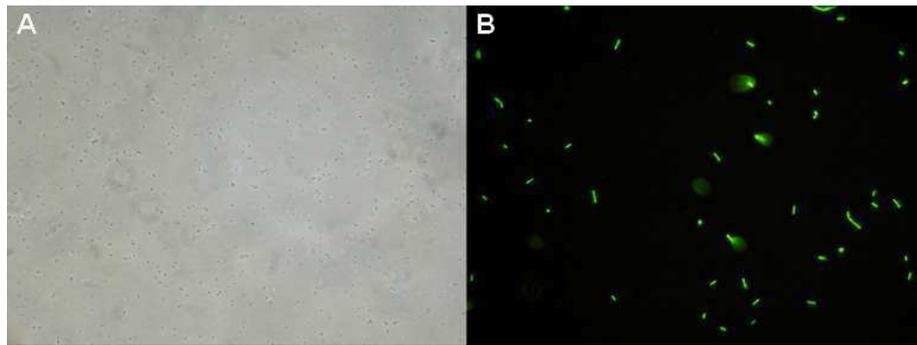
- Glucose 0,6%
- MgSO<sub>4</sub> 0,03%
- CaCO<sub>3</sub> 0,02%

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**

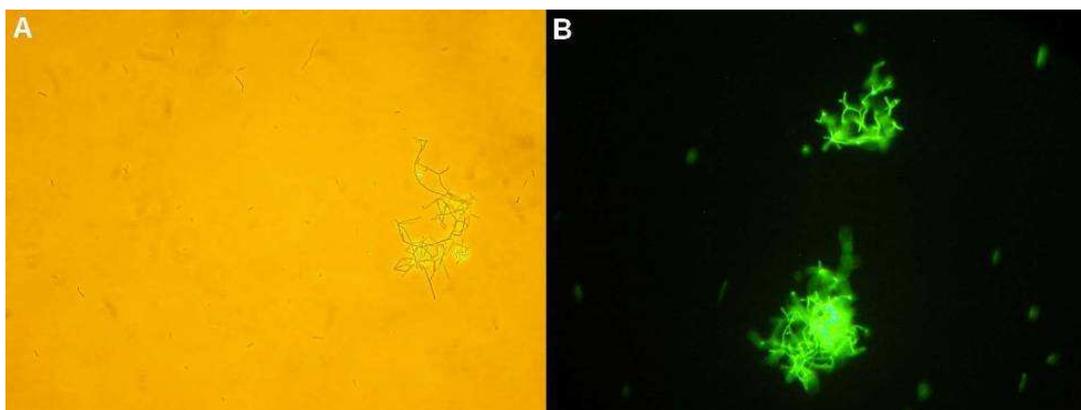
Des observations effectuées immédiatement après filtration et avant l'inoculation des bactéries, permettent de vérifier que l'on a effectivement une population composée uniquement de cellules dispersées. Les microorganismes sont tous marqués avec la même intensité de fluorescence (cf. Figure 66).



**Figure 66 :** Observations microscopiques de *Sphaerotilus natans* 15291 A) après filtration à 5 $\mu$ 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.

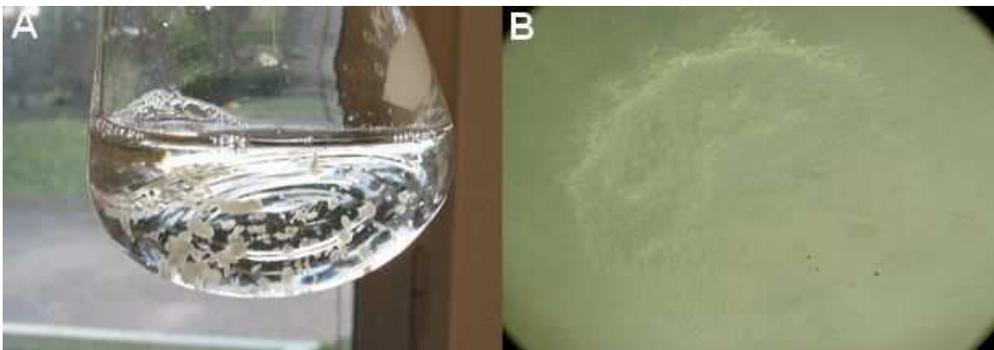
### 1.3.2.2 Croissance après ajout d'une source d'azote

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%

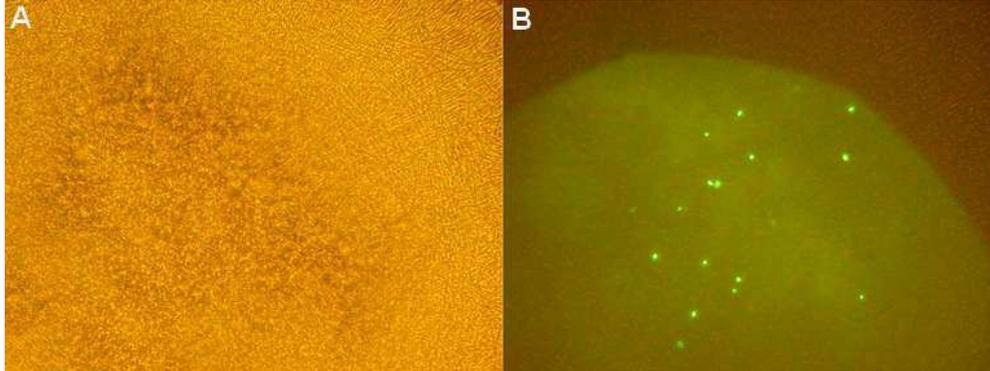
Après 48 heures de culture, 5 mL de cette solution sont ajoutés aux 50 mL de milieu carencé en azote. La culture est à nouveau incubée à 30°C et sous agitation pendant 48 heures. À l'issue de cette nouvelle période d'incubation, on observe une importante augmentation de la biomasse qui se développe sous 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.**

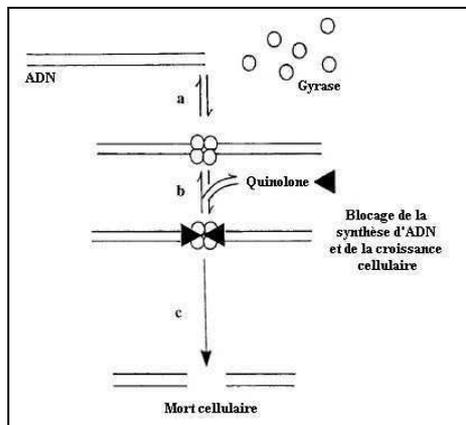
Il est cependant important de noter que la solution ajoutée et apportant l'azote nécessaire à la division cellulaire, fournit également une source de vitamine et de facteurs de croissance grâce aux extraits de levure. Il pourrait être intéressant de réitérer cette expérience soit en apportant dès le 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  $\text{NH}_3$ . 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).

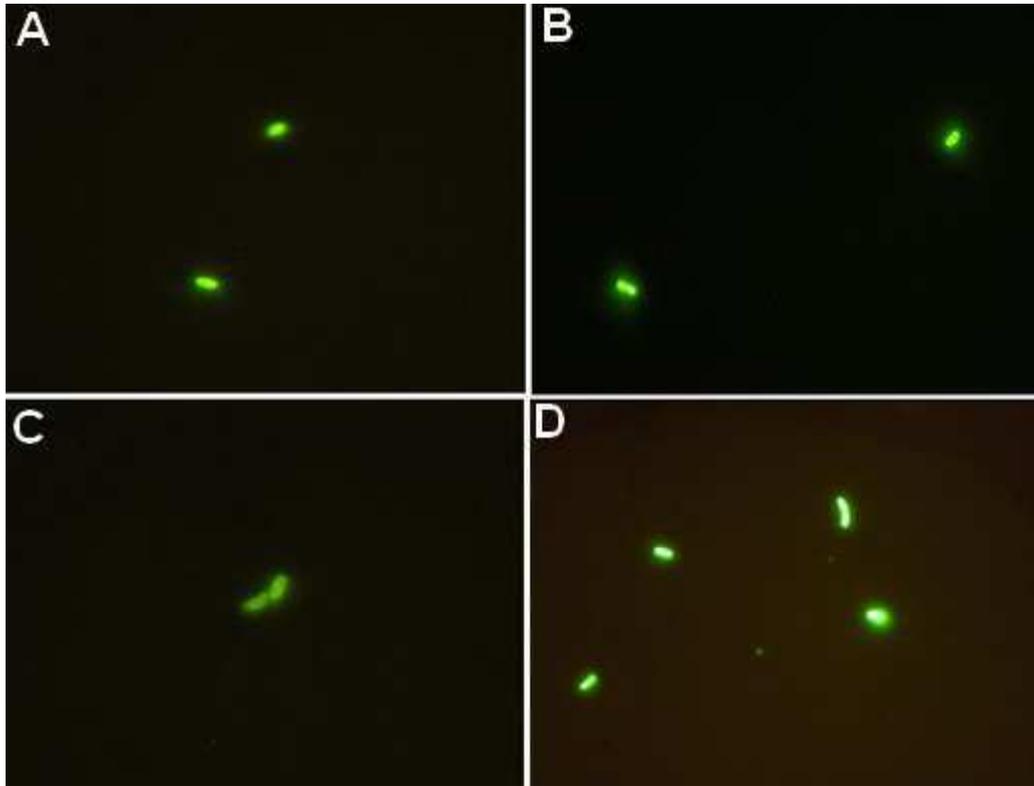


**Figure 70 : Représentation schématique des événements impliqués dans la mort cellulaire induite par l'action des quinolones.** a) l'interaction entre les ADN gyrases (complexe formé par les gyrases et topo-isomérases IV) et l'ADN permet un surenroulement négatif de l'ADN, nécessaire au processus de 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, ce qui conduit 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  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  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  $30^\circ\text{C}$  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  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  et après marquage au cFDA/SE. Observations A) et B) immédiatement après inoculation des bactéries, C) et D) après 48 heures d'incubation à  $30^\circ\text{C}$  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.

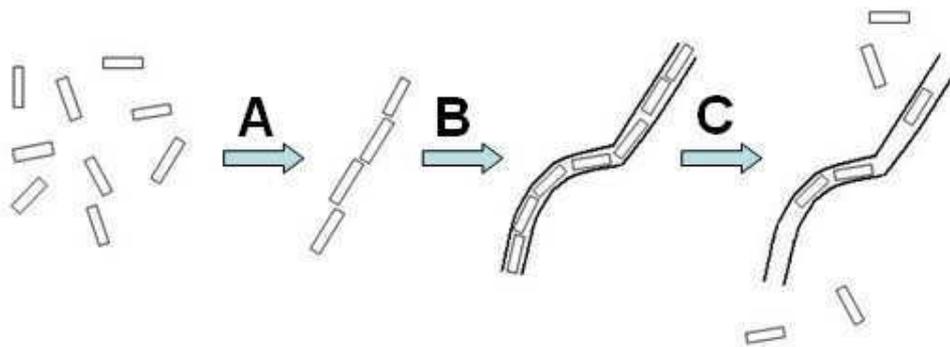
Cependant, une carence en azote entraîne également un déficit de la synthèse protéique chez les microorganismes, qui pourrait empêcher les bactéries de synthétiser les polysaccharides et enzymes nécessaires à la structuration du filament et de la gaine. C'est pourquoi la croissance de *S. natans* dans 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 exclut 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  $\mu\text{m}$ .
- 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 *sthAFOR* et *sthAREV*.**

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  $MgCl_2$  : 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](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.

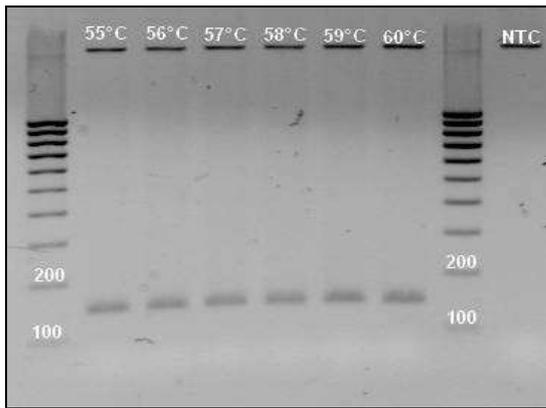
Ces résultats permettent de mettre en évidence la spécificité, sur un plan théorique, des amorces sthA FP et sthA RP pour l'espèce *Sphaerotilus natans*, et pour le gène *sthA*.

#### 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	

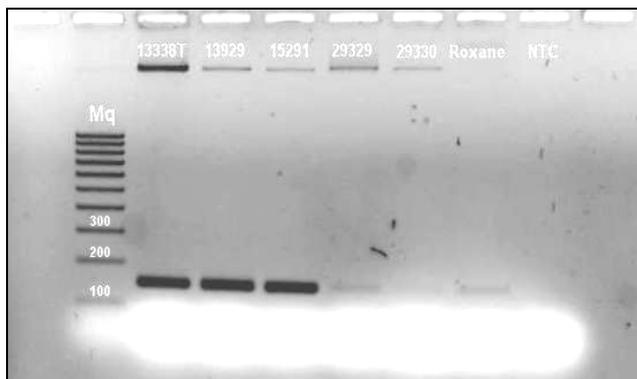
**Tableau 15 : Profil d'amplification utilisé pour déterminer la température d'hybridation optimale du couple d'amorces sthAFP/sthA RP.**



**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<sup>TM</sup> QPCR SYBR<sup>®</sup> 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 MgCl<sub>2</sub>, 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'amorces<sup>1</sup> :

- ✓ *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 MgCl<sub>2</sub> 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.

---

<sup>1</sup> 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.

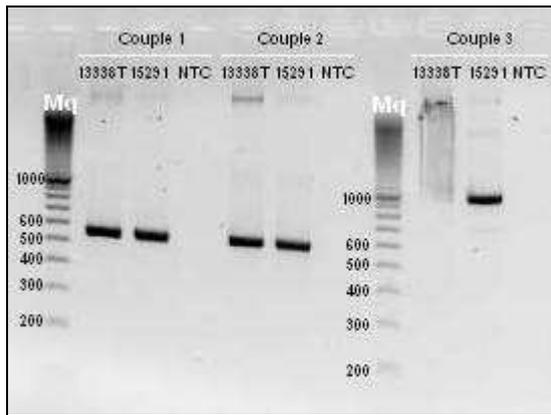
Dans un second temps, le gène *sthA* a été amplifié en le divisant en trois fragments chevauchants à l'aide de différents jeux d'amorces.

- 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.

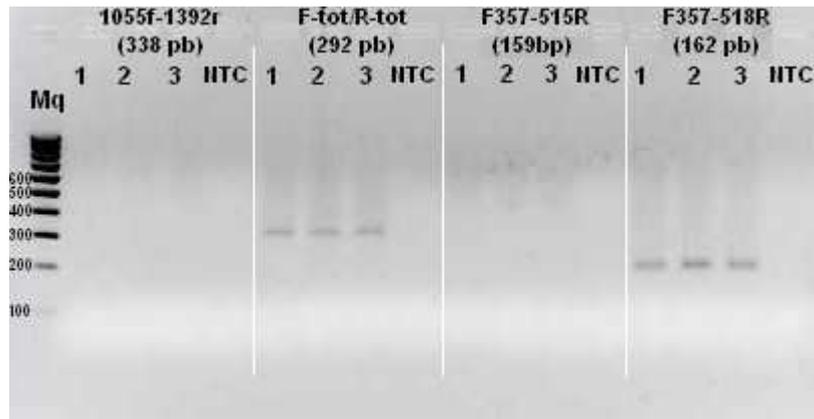
### **1.4.3 Étude de l'expression du gène *sthA* en fonction de la morphologie adoptée par *S. natans* par RT-PCR quantitative en temps réel**

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.



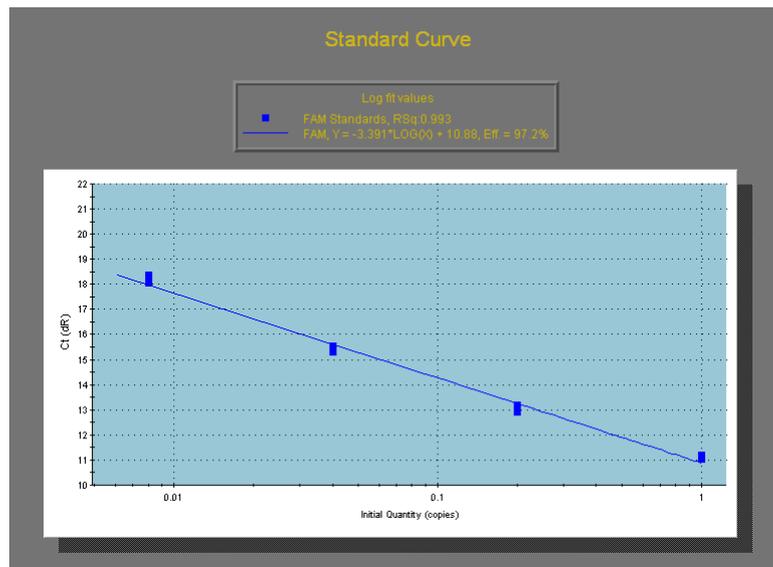
**Figure 77 : Électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% des produits de PCR obtenus lors du test des différents couples d'amorces pour l'amplification d'un fragment de l'ADN 16S.** L'amplification a été réalisée sur l'ADN de trois souches de *S. natans* : 13338T (1), 13929 (2) et 15291 (3). La taille du 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<sup>ème</sup>. 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%.

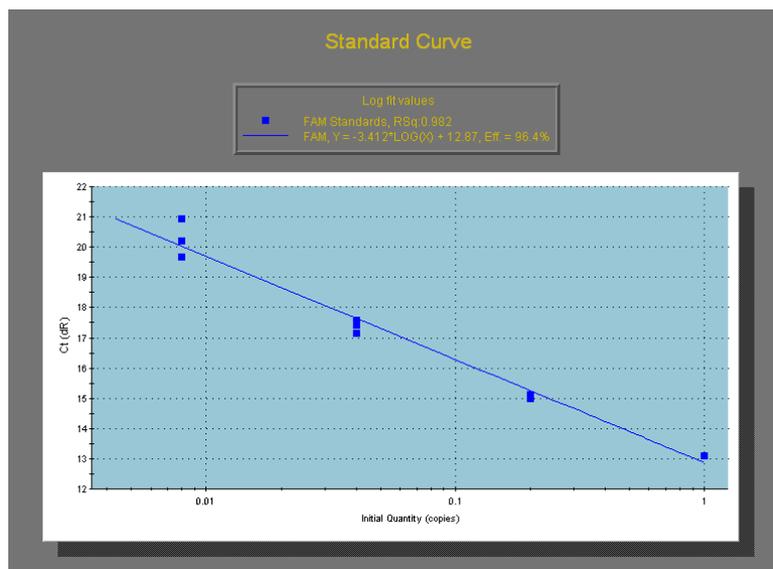
Le profil d'amplification de la réaction de PCR est indiqué dans le tableau suivant :

Activation de la Taq polymérase	95°C	10 minutes	
Amplification du fragment d'intérêt	95°C	30 s	40 cycles
	56°C	30 s	
	72°C	30 s	
Courbe de dissociation	95°C	1 min	41 cycles
	55°C → 95°C	30 s par palier de 1°C	

**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*.**



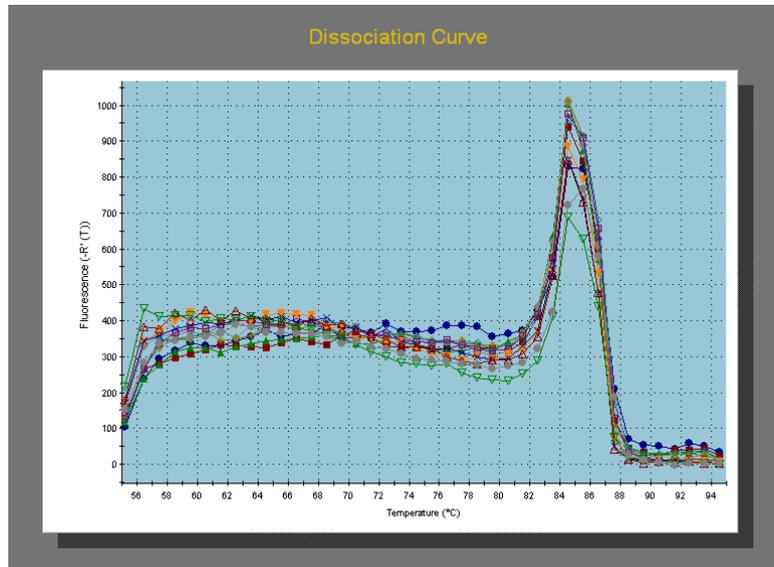
**Figure 78 : Droite standard obtenue après amplification du fragment du gène *sthA* de *S. natans* 15291 avec le couple d'amorces *sthA* FP/*sthA* RP.**



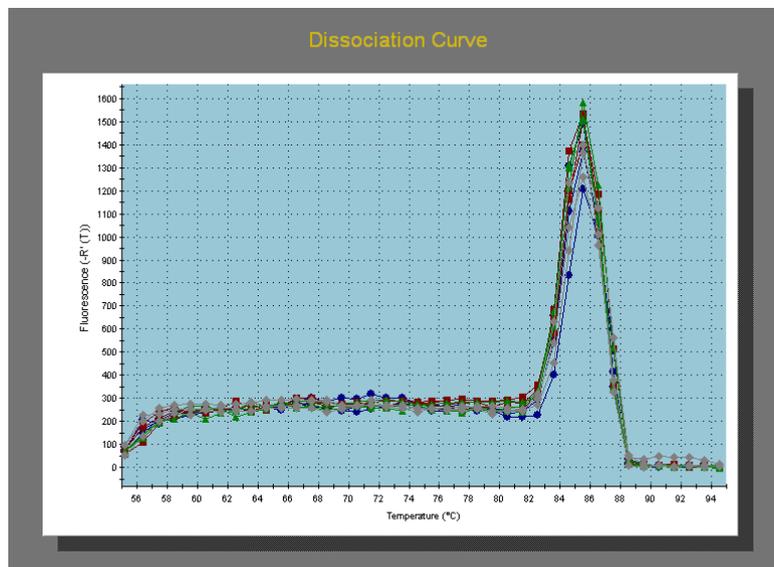
**Figure 79 : Droite standard obtenue après amplification du fragment de l'ADNr 16S de *S. natans* 15291 avec le couple d'amorces 357F/518R**

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<sup>ème</sup> 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.

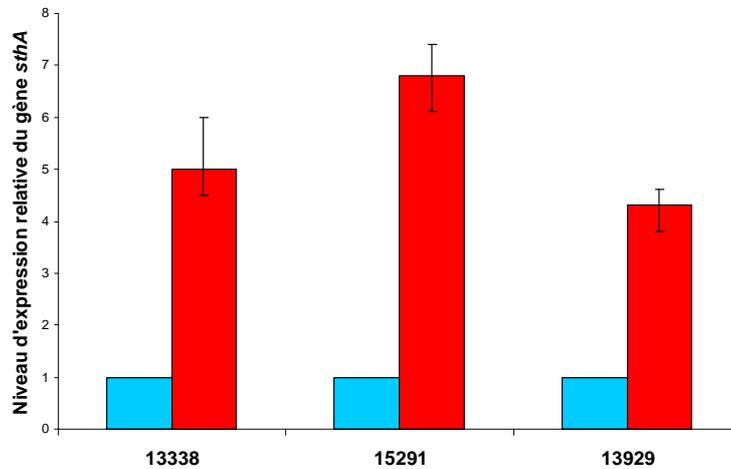
Les cycles seuils obtenus avec les deux jeux d'amorces *sthA* et 16S sont utilisés afin de comparer l'expression du gène en utilisant la méthode de calcul du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (cf. Tableau 17).

Échantillon	Ct <sub>cible</sub>	Ct <sub>cible</sub> moyen	Ct <sub>ref.</sub>	Ct <sub>ref.</sub> 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).

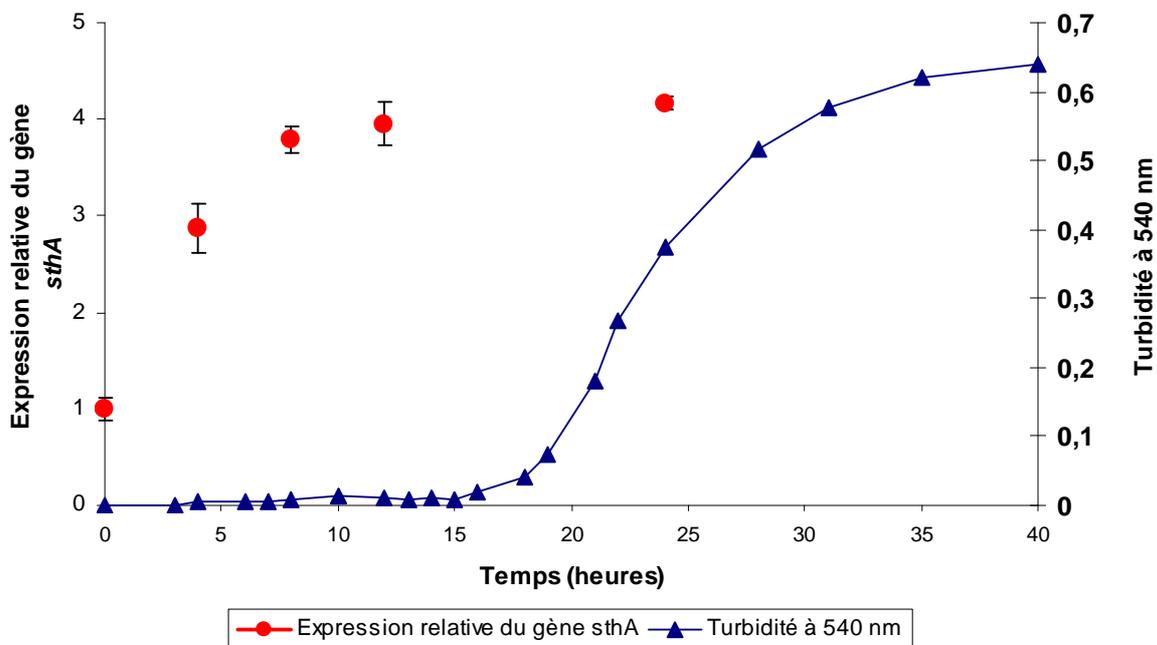


Figure 83 : Courbe de croissance de la souche *S. natans* 15291 (▲) durant l'induction de la filamentation par transfert des bactéries dispersées dans un milieu pauvre en nutriment, et évolution du niveau d'expression du gène *sthA* (●) lors de la croissance.

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.

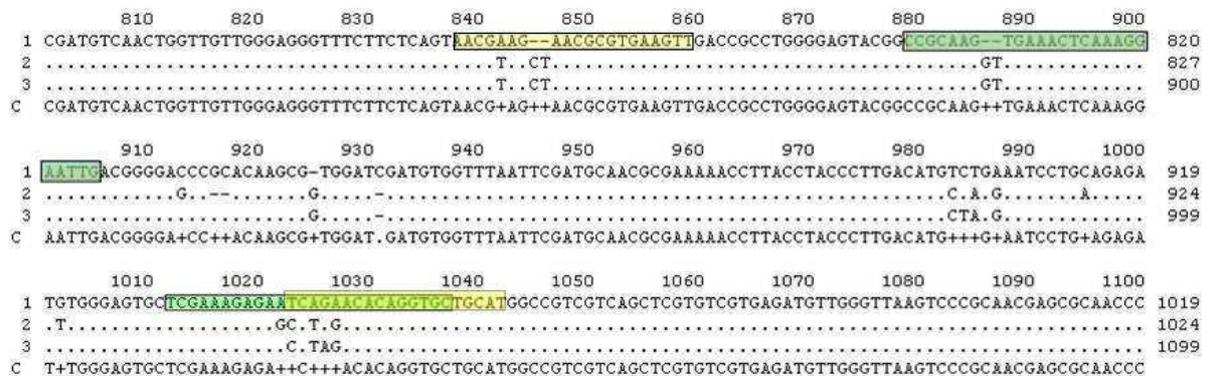
##### **1.4.4.1 Stratégie d'utilisation de l'ADN 16S**

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<sup>j</sup>. 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.



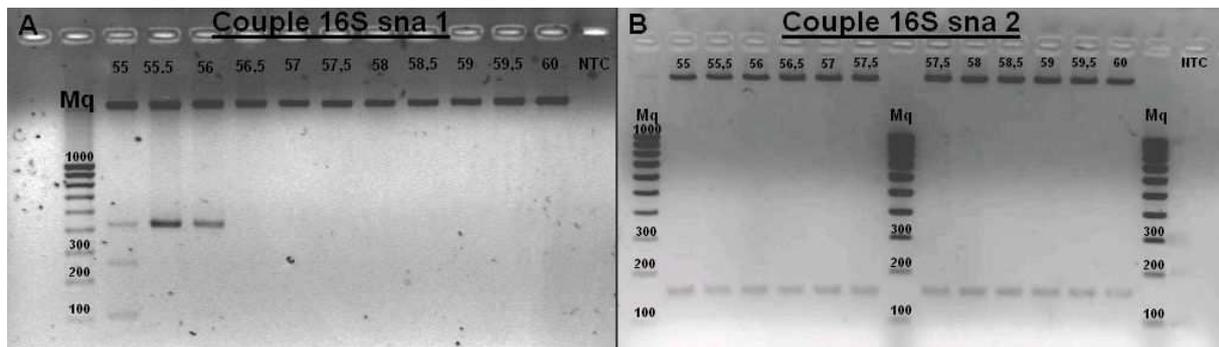
**Figure 84 : Alignement à l'aide du programme Clustalw des séquences de l'ADN 16S de (1) *Sphaerotilus natans*, (2) *Leptothrix discophora* et (3) *Leptothrix mobilis*, détermination d'une séquence consensus (C), et positionnement des amorces sens et anti-sens pour les couples 16S sna 1 (■) et 16S sna 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*<sup>k</sup>.

<sup>j</sup> 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.

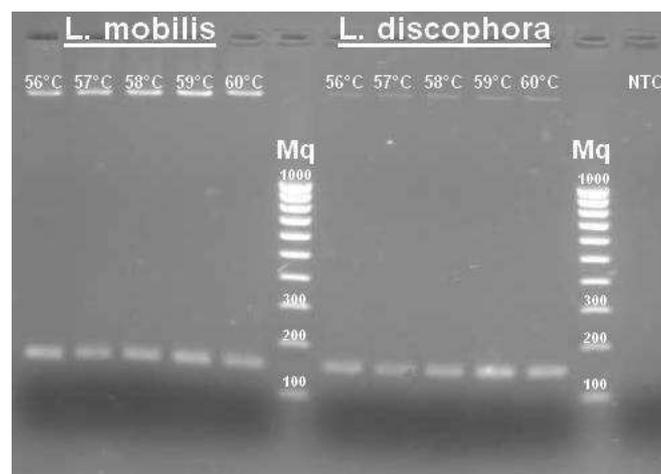
- Pour le couple 16S sna 1, des fragments d'ADN sont amplifiés dans certains cas mais aucun fragment d'ADN correspondant à celui attendu n'a été observé malgré les tentatives d'ajustement de la température d'hybridation ou de la concentration en  $MgCl_2$  lors de la réaction de PCR.
- Concernant le 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.

<sup>k</sup> 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 MgCl<sub>2</sub> 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

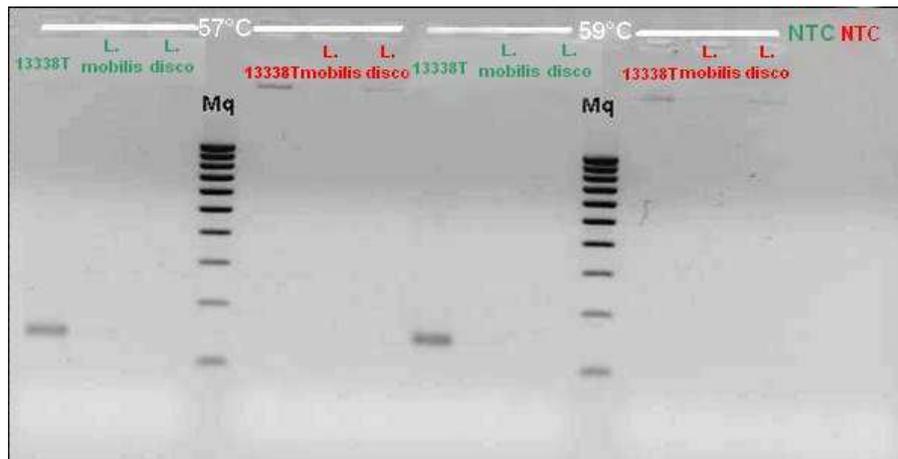
#### 1.4.4.3 Stratégie d'utilisation du gène *sthA*

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. hydroxsis*, *E. coli*, *P. mendocina*. Cette analyse, non exhaustive, cible des bactéries relativement éloignées phylogénétiquement de *S. natans*. Cependant, *Thiothrix* et *Haliscomenobacter hydroxsis*, 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  $\mu\text{m}$ . Les cellules contenues dans 500  $\mu\text{L}$  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<sup>-1</sup>. L'ADN est ensuite extrait à partir de 500  $\mu\text{L}$  de chacune de ces solutions. Ces différentes fractions sont toutes reprises dans 100  $\mu\text{L}$  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.

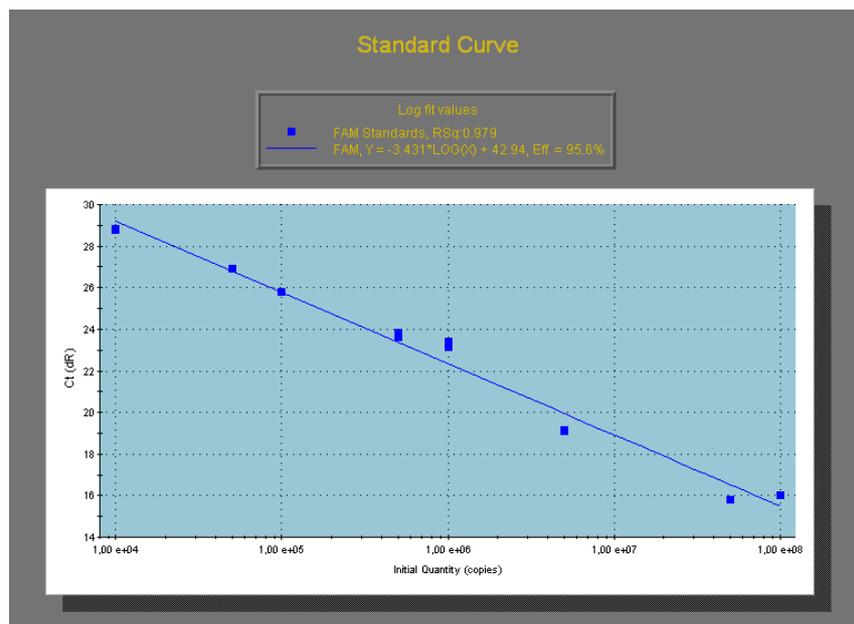


Figure 88 : Courbe de calibration obtenue lors de la quantification de *S. natans* en utilisant les amorces *sthA* FP et *sthA* RP.

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<sup>-1</sup>. 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" (R<sup>2</sup>), 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 <sup>7</sup>	FAM	Unknown	---	15,03	8,52E+07	0,995	-3,531
9.10 <sup>7</sup>	FAM	Unknown	---	15,06	8,49E+07	0,995	-3,531
5.10 <sup>7</sup>	FAM	Unknown	---	15,72	5,55E+07	0,995	-3,531
5.10 <sup>7</sup>	FAM	Unknown	---	15,74	5,45E+07	0,995	-3,531
1.10 <sup>7</sup>	FAM	Unknown	---	18,12	1,15E+07	0,995	-3,531
1.10 <sup>7</sup>	FAM	Unknown	---	18,04	1,22E+07	0,995	-3,531
5.10 <sup>6</sup>	FAM	Unknown	---	19,26	5,51E+06	0,995	-3,531
5.10 <sup>6</sup>	FAM	Unknown	---	19,18	5,46E+06	0,995	-3,531
1.10 <sup>6</sup>	FAM	Unknown	---	22,09	8,70E+05	0,995	-3,531
1.10 <sup>6</sup>	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 <sup>-1</sup> )	Quantification par QPCR (cellules.mL <sup>-1</sup> )
9.10 <sup>7</sup>	8,5.10 <sup>7</sup>
5.10 <sup>7</sup>	5,5.10 <sup>7</sup>
1.10 <sup>7</sup>	1,18.10 <sup>7</sup>
0,5.10 <sup>7</sup>	0,55.10 <sup>7</sup>
0,1.10 <sup>7</sup>	0,09.10 <sup>7</sup>

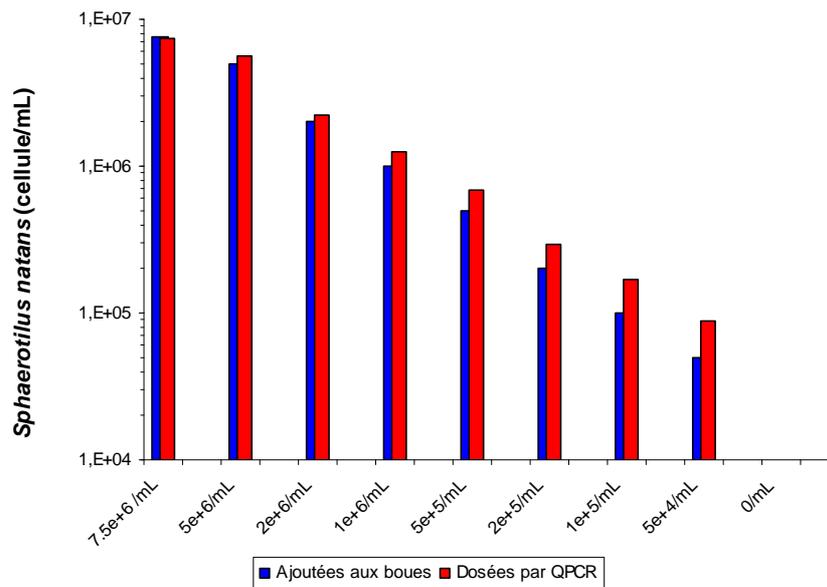
**Tableau 19 : Tableau comparatif des résultats obtenus lors des quantifications par cytométrie en flux et QPCR.**

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<sup>-1</sup> 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.

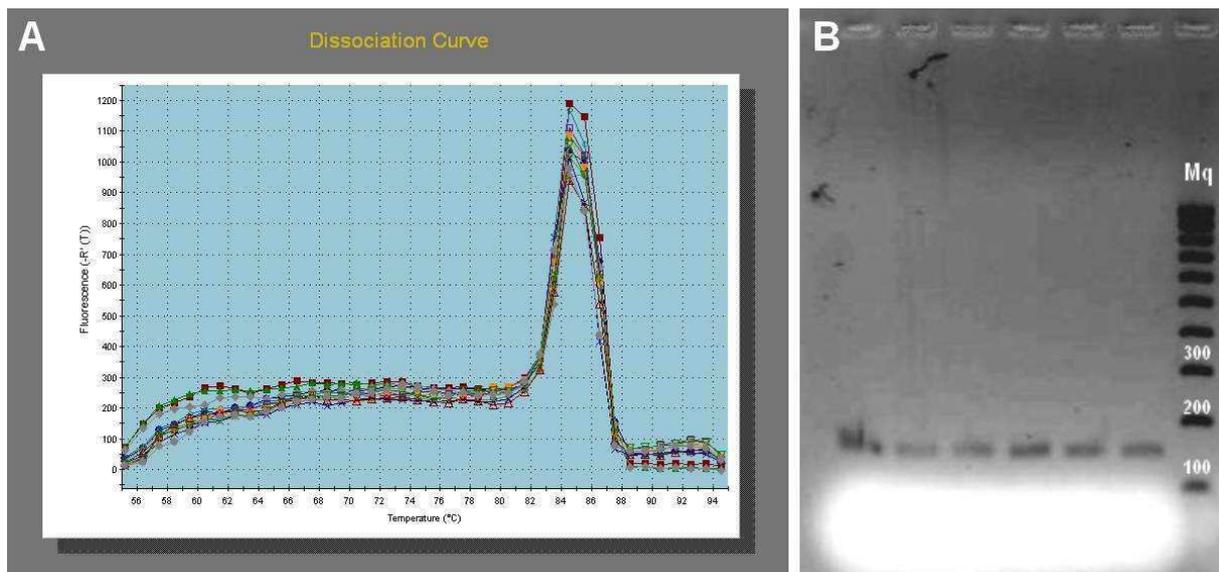
La représentation sous forme d'histogramme permet d'apprécier si les résultats obtenus par PCR quantitative en temps réel sont proches des concentrations en cellules attendues. C'est le cas ici bien que la technique de biologie moléculaire ait tendance à surestimer les populations. Les résultats chiffrés 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 <sup>6</sup>	7,4.10 <sup>6</sup>
5.10 <sup>6</sup>	5,6.10 <sup>6</sup>
2.10 <sup>6</sup>	2,2.10 <sup>6</sup>
1.10 <sup>6</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>
0,5.10 <sup>6</sup>	0,68.10 <sup>6</sup>
0,2.10 <sup>6</sup>	0,29.10 <sup>6</sup>
0,1.10 <sup>6</sup>	0,17.10 <sup>6</sup>
0,05.10 <sup>6</sup>	0,09.10 <sup>6</sup>

**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).

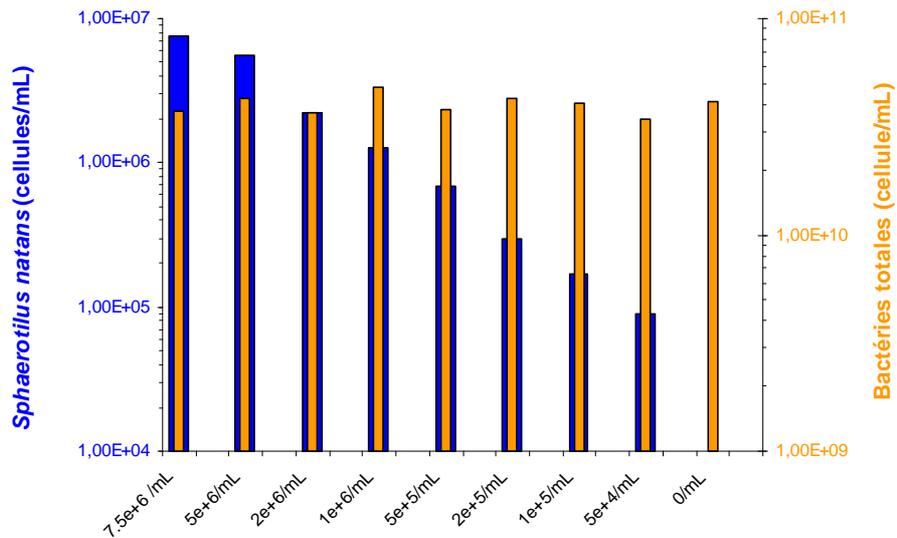


Figure 91 : Histogrammes représentant les quantités de *S. natans* estimées par QPCR dans les boues préalablementensemencées (en bleu), ainsi que la population bactérienne totale dans ces mêmes boues (orange).

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<sup>-1</sup>.

#### 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 gaine<sup>1</sup> 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.

---

<sup>1</sup> Le protocole d'extraction et de purification de la gaine de *S. natans* est détaillé dans l'annexe 10.

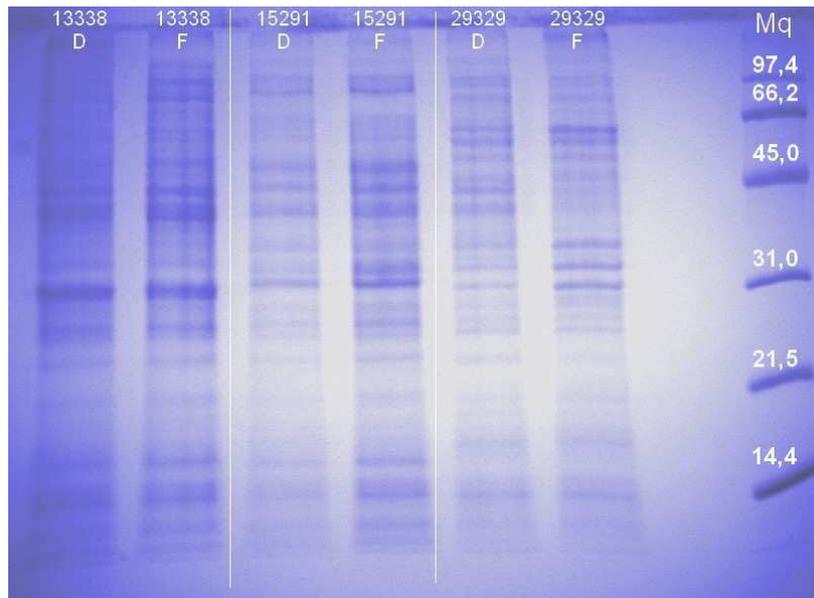
Lors d'expérimentations préalables, un moyen de solubiliser le polysaccharide purifié a été défini. Après différents essais, à l'aide d'ultrasons, de SDS, ou encore de solutions basiques (NaOH) ou acide (HCl), il s'est avéré que seul un traitement au  $\beta$ -mercaptoéthanol aboutissait à une solubilisation 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-iT™ Protein Assay (Invitrogen-Molecular probes). Les séparations SDS-PAGE sont alors réalisées à partir de 10  $\mu$ 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).

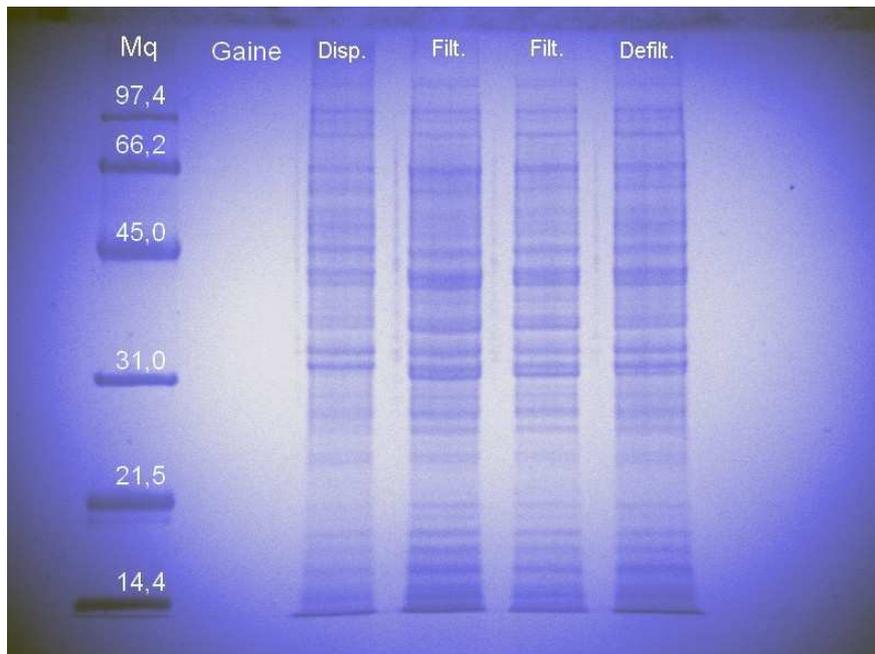


**Figure 92 :** Profils de migration électrophorétique obtenue en SDS-PAGE à 10% d'acrylamide, et après coloration au bleu de Coomassie, des protéines totales extraites de culture des souches *S. natans* 13338T, 15291 et 29329 sous leurs formes dispersée (D) et filamenteuse (F). Mq : Marqueur de masses 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>m</sup>.

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.

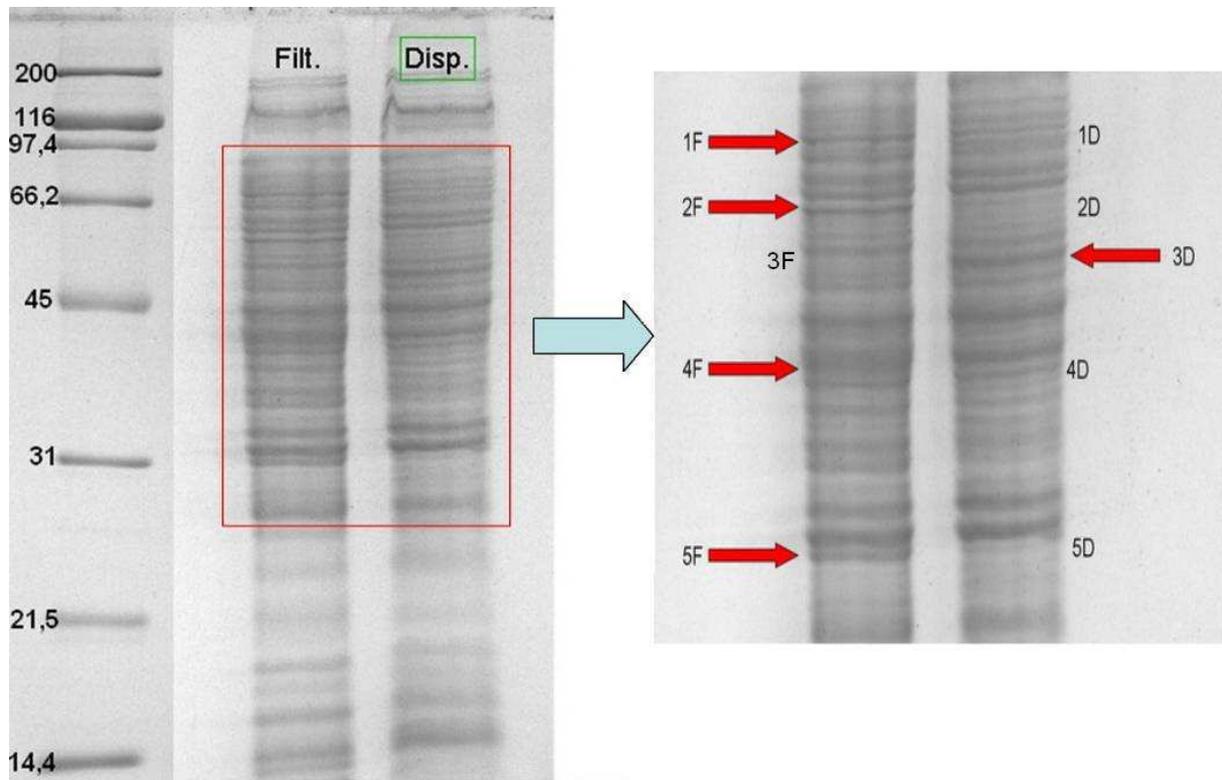
Une seconde stratégie a donc été employée pour identifier des protéines différemment exprimées entre les deux morphologies de *S. natans*. Des bandes d'intensités différentes ont été découpées à partir de gels SDS-PAGE et analysées en LC-MS-MS.

---

<sup>m</sup> 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).

<b>Protéines exprimées essentiellement par la forme filamenteuse</b>	<b>Protéines exprimées essentiellement par la forme monocellulaire</b>
Bande 1F - Protéine de la division cellulaire FtsH (7/0) <sup>n</sup> - 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) - $\gamma$ -glutamyl phosphate reductase (4/0) - glutamate-cystéine ligase (4/0)	Bande 3D - Arginosuccinate lyase (0/6) - Peptidase U62, (0/4) - Sous-unité $\beta$ de l'ATP synthase F1 (0/26) - Facteur de terminaison de la transcription Rho (3/19) - Isocitrate lyase (3/14)
Bande 4F - Chaîne $\alpha$ 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*.

<sup>n</sup> (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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 (-CH<sub>2</sub>-) 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' $\alpha$ -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  $\gamma$ -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.

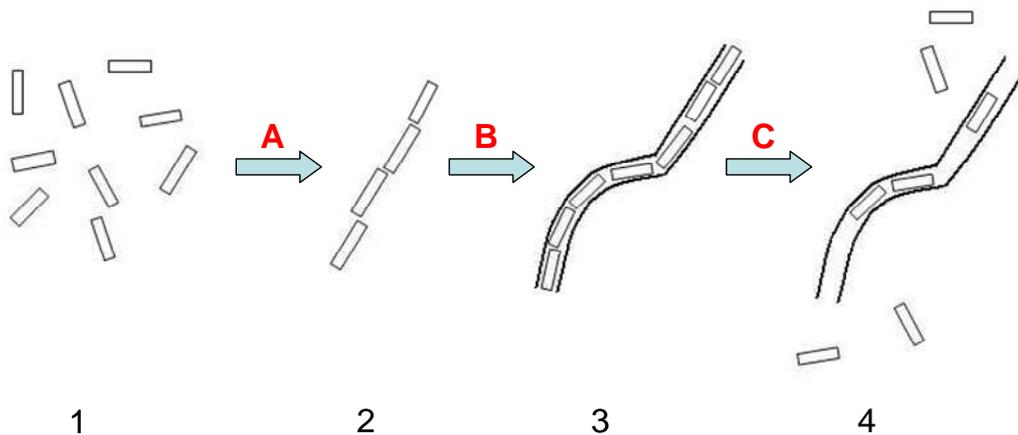
D'après les profils SDS-PAGE, il semblerait qu'une plus grande variété de protéines soit retrouvée chez la forme filamenteuse de la bactérie. Sur les cinq bandes du gel étudiées, une seule est plus intensément marquée pour la forme monocellulaire de *S. natans*. En général, les protéines qui sont plus 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 déduits 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.