

Notre bactérie modèle *Sphaerotilus natans*

3.1 Morphologie

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

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

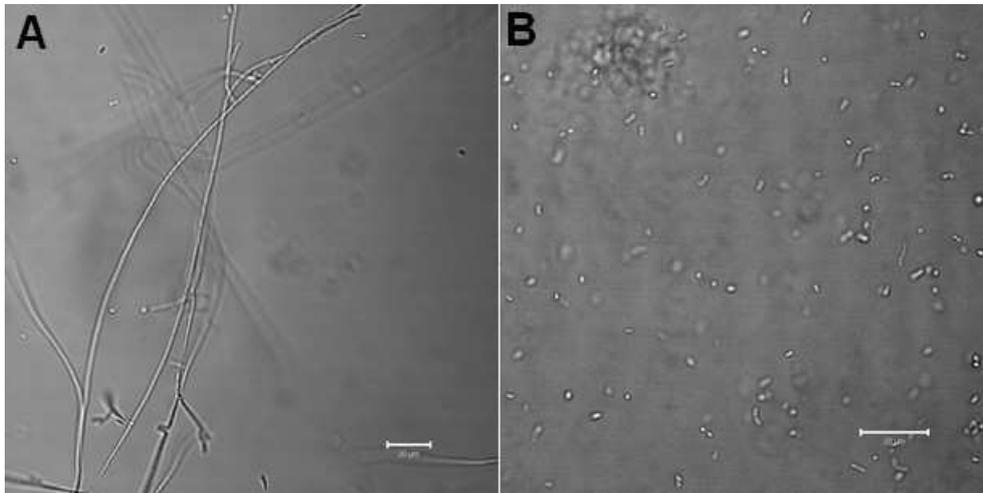


Figure 8 : *S. natans* sous ces deux formes de croissance : A) filamenteuse et B) dispersée (Suzuki *et al.*, 2002)

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

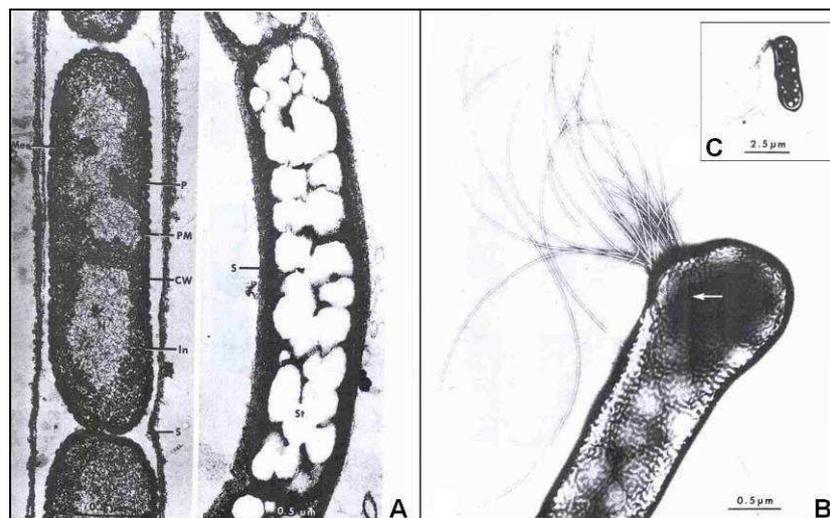


Figure 9 : A) section longitudinale d'un filament gainé de *Sphaerotilus natans* cultivé en bouillon sans glucose (à gauche) et avec glucose (à droite). B) Touffe de flagelles dans la région subpolaire d'une cellule dispersée et mobile. C) Cellule dispersée flagellée

3.2 Phylogénie

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

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

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

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

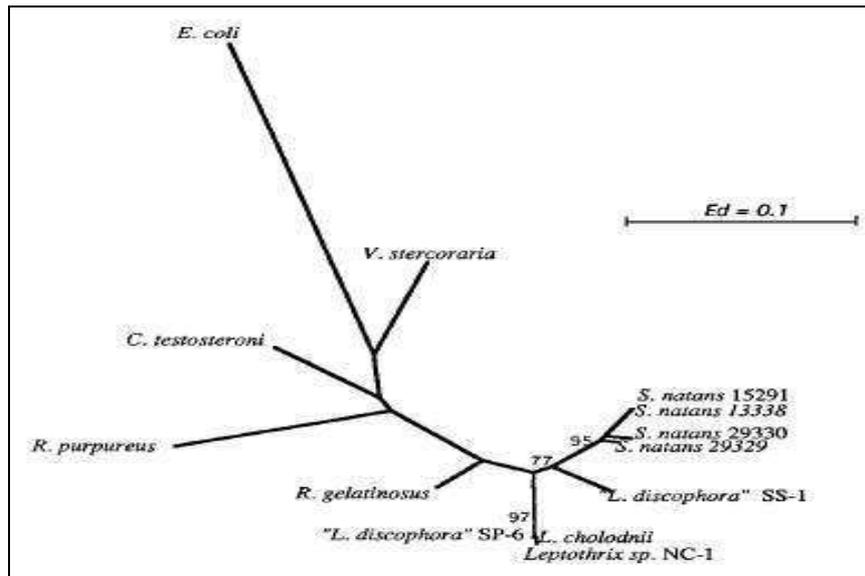


Figure 10 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences partielles du gène de l'ARNr 16S (Siering & Ghiorse, 1996)

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

3.3 Physiologie générale

3.3.1 Sources de carbone et d'énergie

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

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

3.3.2 Sources d'azote

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

3.3.3 Température

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

3.3.4 pH

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

3.3.5 Besoins en oxygène

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

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

3.4 *Les différentes contributions de S. natans*

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

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

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

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

3.4.2 Contributions éventuelles à la médecine

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

3.5 Dimorphisme de *S. natans* :

3.5.1 En cultures pures

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

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

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

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

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

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

3.5.2 En boues activées

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

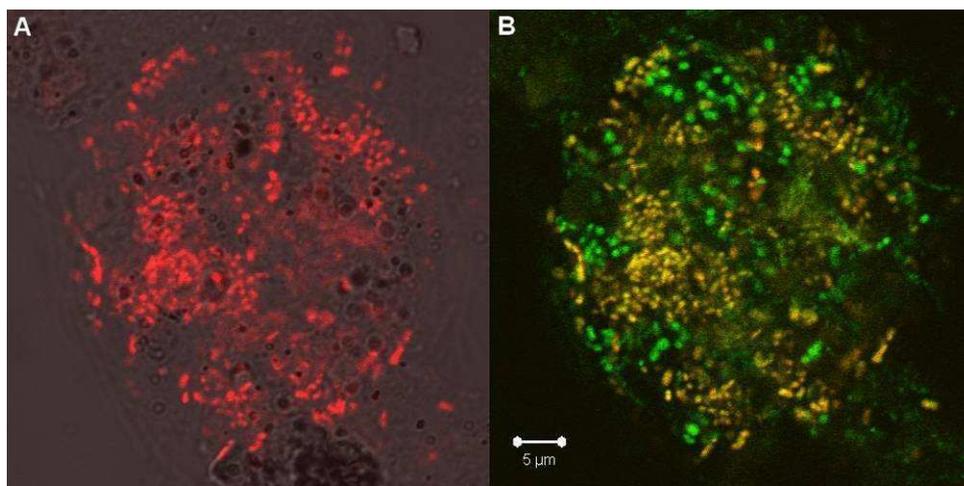


Figure 11 : Mise en évidence de la présence de *S. natans* sous forme monocellulaire au sein d'un floe de boues activées. A) Hybridation des bactéries avec la sonde SNA marquée au Cy3. B) Hybridation des sondes SNA-Cy3 et EUB338-FITC.

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

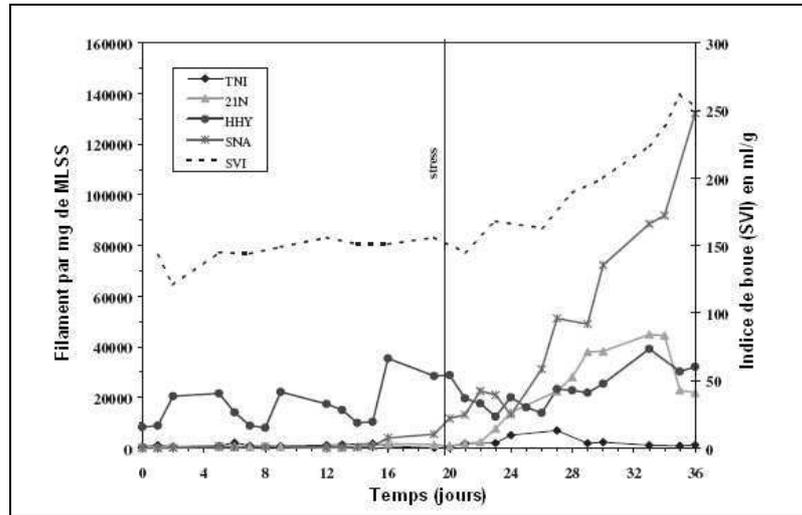


Figure 12 : Effet de l'application d'un stress sur la population filamenteuse d'une boue activées et l'indice de boue (SVI). Les différentes bactéries filamenteuses suivies sont *T. nivea* (TNI), Type 021N (21N), *H. hydrossis* (HHY) et *S. natans* (SNA) (Gaval *et al.*, 2002).

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

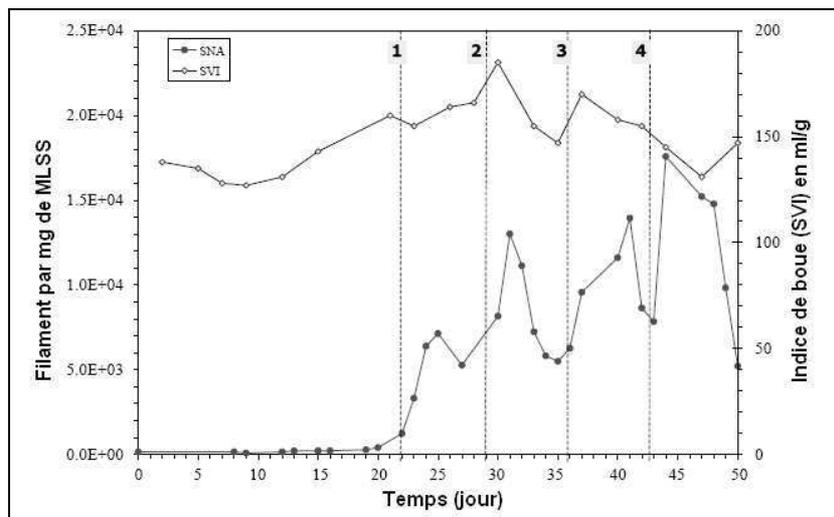


Figure 13 : Évolution des effectifs filamenteux de *S. natans* en boues activées par FISH (SNA), ainsi que de l'indice de boue (SVI) après application séquentielle de 4 stress.

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

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

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

3.6 La gaine de *S. natans*

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

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

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

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



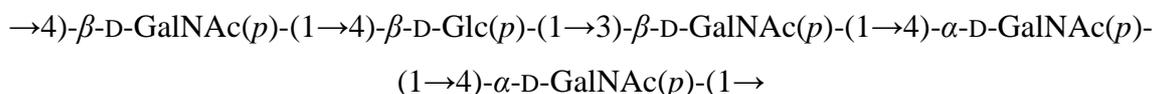
Figure 14 : Mise en évidence de la gaine par coloration au cristal violet (d'après FNDAE N°33)

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

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

3.6.2.1 Polysaccharides

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



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

3.6.2.2 Protéines

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

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

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

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

3.6.3 Dégradation de la gaine

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

3.6.3.1 Dégradation par un microorganisme

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

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

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

3.6.3.2 Mise en évidence d'une enzyme de dégradation

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

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

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

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

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

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

3.7 Les polysaccharides extracellulaires produits par *S. natans*

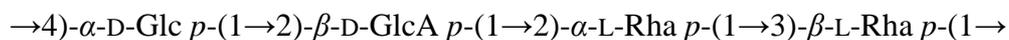
S. natans synthétise également un exopolysaccharide (EPS) entourant la gaine du filament.

3.7.1 Structure et composition

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

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

Ce tétrasaccharide est construit de la façon suivante :



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

3.7.2 Rôle et dégradation du polysaccharide

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

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

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

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

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

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

3.8.1 Identification du gène *sthA*

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

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

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

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

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

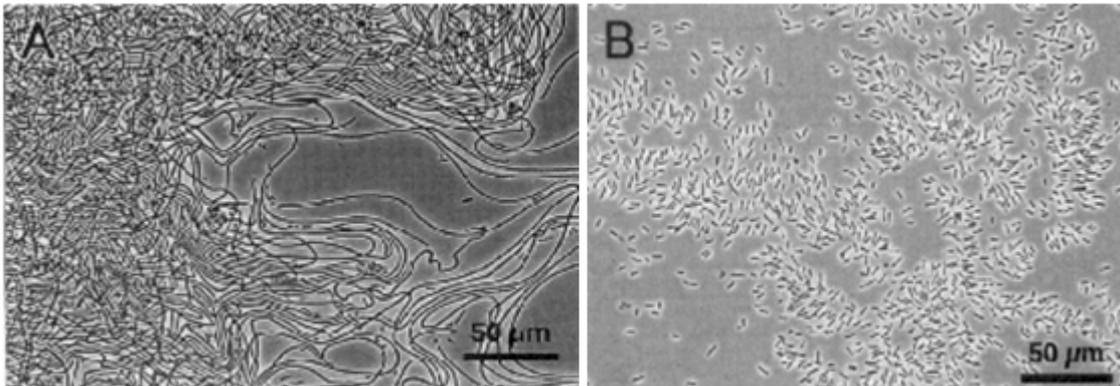


Figure 15 : *S. natans* de A) souches sauvages et B) *sthA* déficiente. Les deux souches sont cultivées sur milieu NB à 0,1 %, induisant normalement la filamentation.

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

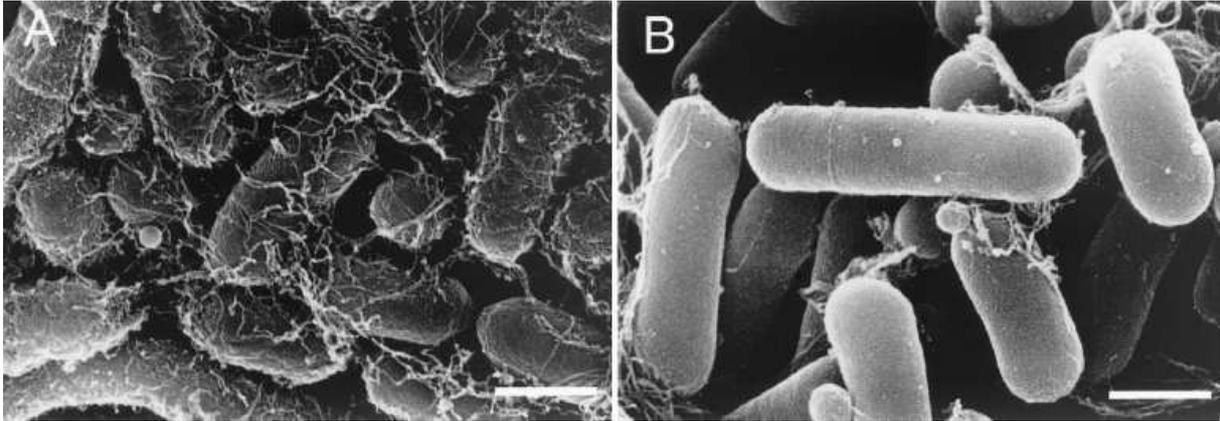


Figure 16 : Observation de cellules dispersées de *S. natans* pour les souches A) sauvages et B) *sthA*-déficiente.

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

3.8.3 Expression du gène *sthA*

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

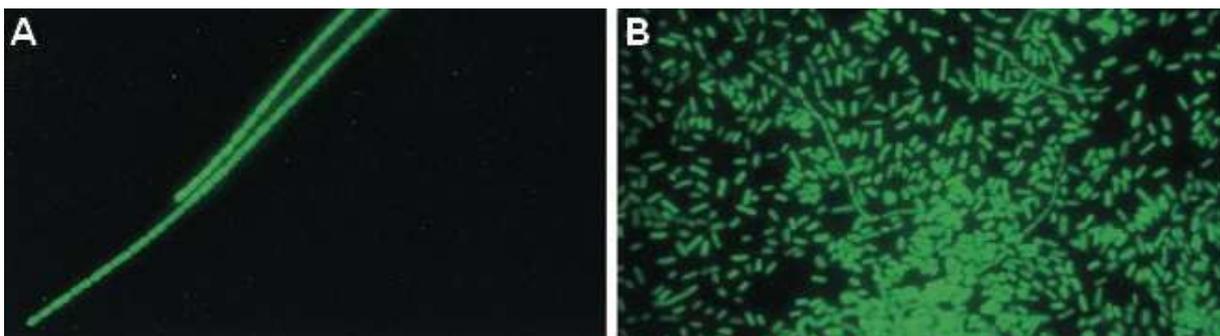


Figure 17 : Expression de la GFP dans les cellules A) filamenteuses, cultivées sur milieu NB 0,1 % et B) dispersées cultivées sur milieu NB 1 % (d'après Suzuki et *al.*, 2002).

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