

## **Détection, identification et quantification des microorganismes filamenteux**

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

### ***4.1 Méthode d'identification classique : observation microscopique***

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

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

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

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

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

## **4.2 Méthodes d'identification moléculaires**

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

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

### **4.2.1 PCR et QPCR**

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

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

### **4.2.2 Clonage d'ARNr 16S**

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

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

### 4.2.3 FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization)

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

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

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

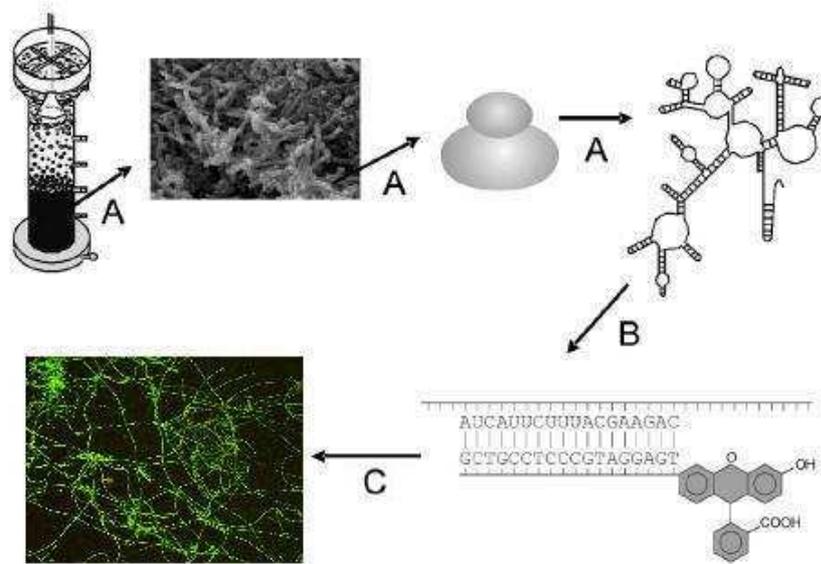
Des sondes ciblant les principales espèces bactériennes filamenteuses ont également été mises au point (cf. Tableau 5).

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

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

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

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



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

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

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

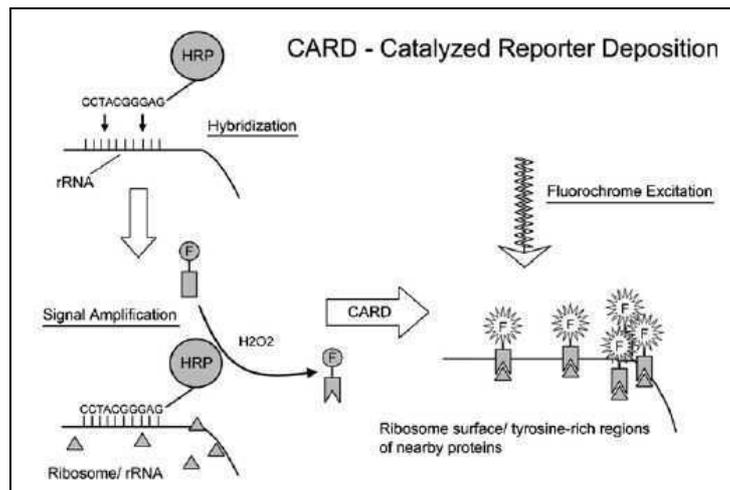


Figure 19 : Description schématique du principe de la technique CARD-FISH (Sanz & Köchling, 2007)

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

#### 4.2.3.1 Les limites de la technique FISH :

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

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

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

#### **4.2.4 Techniques d'empreintes génétiques**

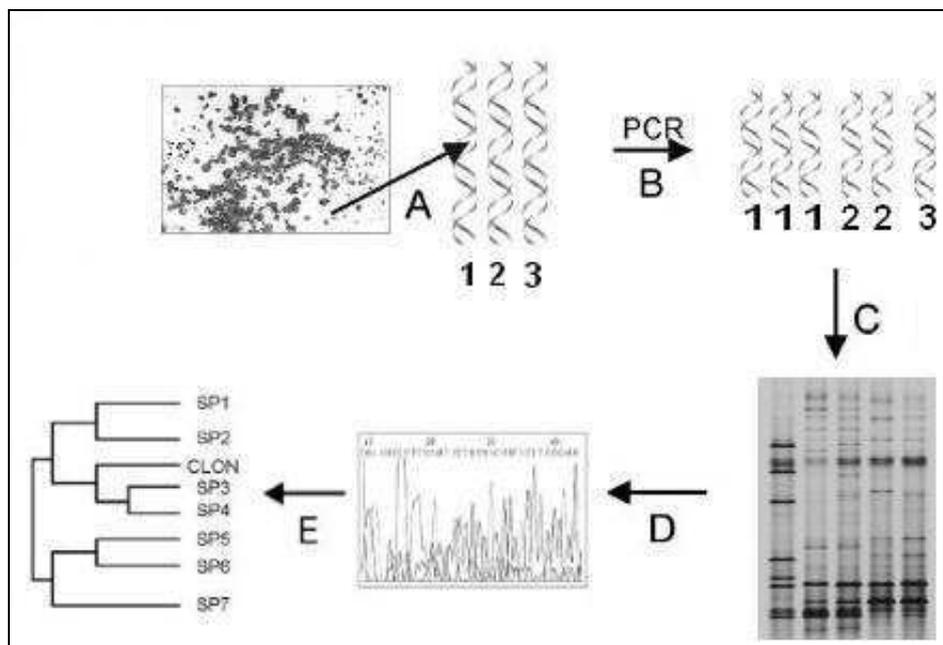
Ces techniques de biologie moléculaire dites d'empreintes génétiques (genetic fingerprinting) permettent de fournir un aperçu ou profil de la diversité d'une communauté bactérienne. Dans ce paragraphe, les principales techniques d'analyse génétique employées dans le domaine de l'écologie microbienne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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

- ***ARISA***

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

- ***T-RFLP***

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

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

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

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

- ***Limitations de ces techniques***

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

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

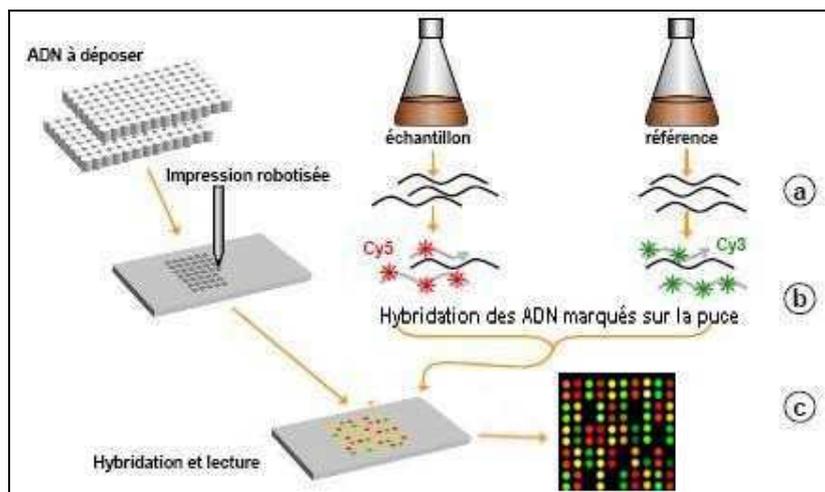
Dans certains cas, la création de référentiels est complexe à mettre en place puisque certaines souches ne peuvent être cultivées.

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

#### 4.2.5 Analyses par Microarray ou puce à ADN

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

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



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

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

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

## 5. Conclusion

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

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

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

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

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

